

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR
RAYMOND BÉLANGER

CONCEPTION ET ÉVALUATION D'UN PHOTOMÈTRE PORTATIF DE
PHOTOACOUSTIQUE ET DE FLUORESCENCE

MARS 1992

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RÉSUMÉ

La technique de la photoacoustique conventionnelle est maintenant incluse dans un appareil compact et portable. Cet instrument de mesure a été conçu pour être utilisé lors de l'évaluation de l'activité photosynthétique sur le terrain. En plus de la technique photoacoustique, le DOOZER (surnom de l'appareil portable) comprend la technique de la fluorescence qui permet la mesure de la fluorescence de la chlorophylle. Le contrôle et la prise de données sont entièrement faits par l'ordinateur portable.

La partie photoacoustique comprend i) la technique de la photoacoustique conventionnelle utilisant à l'excitation une source de lumière modulée, et ii) la technique de la photoacoustique pulsée employant comme source excitatrice une courte impulsion lumineuse. Avec la partie photoacoustique, il est possible de mesurer la quantité de chaleur émise par un échantillon suite à l'absorption de la lumière modulée et ainsi calculer la quantité d'oxygène dégagée par l'échantillon photosynthétique. La partie de la fluorescence permet la mesure de l'induction de la cinétique de la fluorescence de la chlorophylle (Rfd) ainsi que le rapport des intensités des deux bandes de la fluorescence prises à l'état stationnaire (F680/F740).

Les expériences faites en laboratoire ont servi à l'évaluation de la performance de l'appareil portable. L'une des mesures a été celle du rapport signal-sur-bruit (S/N) et ce rapport pour la partie

photoacoustique se situe en moyenne à environ 20 000 avec le noir de carbone comme standard. L'autre test a été celui de l'inhibition de la photosynthèse par le DCMU. Ce test a permis de constater, non seulement que l'appareil peut mesurer l'inhibition de la photosynthèse, mais aussi, possiblement la mesure du transport cyclique d'électrons autour du photosystème 1.

L'étude des phénomènes reliés à la génération du signal photoacoustique montre que la forme de l'onde de la modulation du faisceau d'analyse n'affecte pas l'exposant de la fréquence angulaire. On a noté que l'intensité du signal photoacoustique est proportionnelle à l'aire sous la courbe de l'onde sinusoïdale de la modulation. Et toujours dans le cadre de l'analyse quantitative du signal photoacoustique, l'amplitude du signal photoacoustique mesurée en présence d'une lumière blanche non-modulée et de forte intensité, a permis d'observer que le signal photoacoustique est inversement proportionnel à la température de l'échantillon.

Enfin, les mesures *in situ* de la photosynthèse démontrent que i) l'appareil portatif fonctionne aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur pour l'examen de l'activité photosynthétique et que ii) l'activité photosynthétique d'arbres dépéris à différents stades de dépérissement est la même. Les valeurs d'activité photosynthétique que nous avons mesurées dépendent plus de l'environnement immédiat de l'arbre que son état morphologique pour un site d'échantillonnage donné.

PRÉFACE

"Dieu dit: << Que la terre verdisse de verdure: des herbes portant semence et des arbres fruitiers donnant sur terre selon leur espèce des fruits contenant leur semence >> et il en fut ainsi. La terre produisit de la verdure: des herbes portant semence selon leur espèce, des arbres donnant selon leur semence, et Dieu vit que cela était bon." (Genèse 1: 11-12)

Ce passage de la Bible est sûrement le plus beau et le plus ancien texte décrivant la beauté du monde végétal. La végétation nous a été donnée pour que l'Homme puisse vivre des fruits de la récolte, mais aussi le seul spectacle d'une forêt dense d'été ou encore les mille couleurs de l'automne suffisent pour vraiment apprécier la vie. Malheureusement le tableau déteint, nos forêts meurent. Et si la nature meurt, alors nous mourrons aussi car elle est la source servant à maintenir la vie. On se doit donc d'agir avant que le processus du dépérissement de nos forêts ne soit irréversible. On doit restorer le jardin d'Éden.

La communauté scientifique a été la première à prendre les moyens médiatiques pour sensibiliser la population. Elle a ainsi évalué quantitativement le niveau de dommages à la végétation provenant des actions aveugles des individus et des industries. Avec résultats à l'appui, les chercheurs auront les moyens nécessaires pour

faire agir nos gouvernements. Et l'injection de fonds dans la recherche aidera à découvrir de nouvelles techniques pour une détection précoce du dépérissement des forêts, et ainsi récupérer le patrimoine forestier avant que les dommages soient irréversibles.

Ce mémoire présente un nouvel appareil portatif utilisant une technique récente et prometteuse pour l'atteinte du but recherché par les scientifiques oeuvrant dans le domaine de la détection du dépérissement. Cette technique est la spectroscopie photoacoustique. Elle est la seule à pouvoir mesurer la quantité d'énergie stockée dans les processus photochimiques, ainsi que la quantité de chaleur et d'oxygène restituée par la feuille, et ceci en une seule mesure. Cet appareil comprend aussi comme composante, la technique fluorimétrique. Un appareil comprenant ces deux techniques est un outil précieux en recherche photosynthétique. Le DOOZER (le nom de l'appareil portatif) est le premier de ce genre. En tant que prototype, il sera bon, pour le prochain de sa génération, de faire quelques modifications afin de réduire son volume, p.ex. en utilisant un ordinateur portatif acceptant une carte du type amplificateur à verrouillage de phase, et à la limite de s'orienter vers la technique de photoacoustique pulsée (bien que l'appareil peut faire ce type de mesure), ce qui enlèverait le faisceau actinique. Ces deux modifications diminueraient de beaucoup le poids et le volume de l'appareil. Cependant, le DOOZER mérite le qualificatif de portatif, car c'est la première fois que la technique est transportée sur le terrain.

C'est en fait le transport du laboratoire dans la nature. C'est ainsi se rapprocher davantage de nos forêts (un retour à la source).

Dans cet ouvrage le parallèle entre la théorie et la pratique est omniprésent. Ceci est primordial car, il n'est pas suffisant d'utiliser les outils pour mesurer une grandeur quelconque, mais il est surtout important de comprendre à fond l'aspect physique qui se rattache à la technique. Ainsi la compréhension de nouveaux phénomènes ne reste pas une question sans réponse, ou encore un autre paradoxe. Concernant la théorie et la littérature, si on accepte sans questionner tout ce qui fut publié dans le passé, alors il n'y aurait aucune recherche. La recherche est le raffinement de la connaissance humaine. Par la connaissance, il est possible de comprendre et ainsi d'éviter les erreurs du passé.

La réalisation de ce projet fut possible grâce à la participation de plusieurs personnes. La première d'entre elles est mon directeur de recherche, monsieur Roger Maurice Leblanc.

André Paquette est la seconde personne en importance dans la réalisation de ce projet. Il fit la programmation et l'électronique du système de mesure. Je le remercie grandement.

Finalement, j'offre toute ma reconnaissance et ma gratitude à mes collègues et amis et spécialement à Christophe N'soukpoé Kossi, Hassan Kassi et Jean-Yves Campion.

TABLE DES MATIERES

	Page
RÉSUMÉ.....	i i
PRÉFACE.....	i v
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	x i
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	x v
CHAPITRES	
I. INTRODUCTION.....	1
A. Pollution et dépérissement des forêts.....	1
B. Mesures de la photosynthèse sur le terrain.....	5
C. État de la recherche.....	10
1. des appareils portatifs pour la mesure de la photosynthèse sur le terrain.....	10
2. de la fluorescence.....	27
3. de la spectroscopie photoacoustique.....	35
D. Objectifs de recherche.....	38
II. THÉORIE.....	40
A. Fluorimétrie.....	40
B. Photoacoustique.....	48
III. CONCEPTION ET MISE AU POINT DU PHOTOMETRE PORTATIF DE PHOTOACOUSTIQUE ET DE FLUORESCENCE.....	60
A. Partie photoacoustique.....	60
B. Partie de la fluorescence.....	64

C.	Pour les mesures sur le terrain.....	65
D.	Traitement des données.....	69
1.	en fluorimétrie.....	70
2.	en photoacoustique.....	71
E.	Mesures de la photosynthèse sur le terrain.....	78
1.	mesures de la fluorescence.....	79
2.	mesures photoacoustiques.....	80
IV.	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	81
A.	Résultats concernant la sensibilité et la performance de l'appareil portatif.....	81
1.	rapport signal/bruit.....	81
2.	inhibition de la photosynthèse avec DCMU.....	84
B.	Comment la forme de la modulation affecte le signal photoacoustique.....	90
1.	avec le noir de carbone.....	91
2.	avec un échantillon photosynthétique.....	98
3.	suggestions pour minimiser l'effet de la forme de la modulation.....	110
C.	L'effet négatif du faisceau actinique.....	111
1.	correction à la théorie photoacoustique.....	119
2.	suggestions pour minimiser l'effet du faisceau actinique.....	134

D.	Résultats préliminaires des mesures sur le terrain.....	135
1.	résultats de fluorescence.....	135
2.	résultats de photoacoustique.....	137
3.	comparaison entre l'examen visuel et les mesures expérimentales.....	139
4.	mesures supplémentaires.....	140
	CONCLUSION.....	148
	BIBLIOGRAPHIE.....	153
	ANNEXE I Modulateur de la D.E.L.....	164
	ANNEXE II Contrôleur d'obturateur électronique.....	166
	ANNEXE III Multiplexeur analogique des signaux.....	168
	ANNEXE IV Module du CAD.....	170
	ANNEXE V Contrôleur d'intensité du faisceau actinique.....	172
	ANNEXE VI Contrôleur du moteur 5 volts utilisé pour le déplacement du filtre dichroïque.....	174

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableaux	
1. Mesures antérieures sur le terrain: première partie.....	12
2. Mesures antérieures sur le terrain: deuxième partie.....	13
3. Caractéristiques du photomètre: première partie.....	67
4. Caractéristiques du photomètre: deuxième partie.....	68
5. Conditions expérimentales pour la détermination de la sensibilité de la partie photoacoustique de l'appareil portatif.....	83
6. Conditions expérimentales pour la détermination de la performance de l'appareil portatif.....	86
7. Résultats sur l'inhibition de la photosynthèse du pois (<i>Pisum sativum</i> L.) par DCMU.....	87
8. Conditions expérimentales pour l'étude de la relation entre le signal photoacoustique et la fréquence, selon la forme de la modulation sur l'échantillon standard, le noir de carbone.....	92
9. Conditions expérimentales pour la mesure de l'effet de la forme de la modulation sur les paramètres photosynthétiques.....	103
10. Effet négatif du faisceau actinique pris sur des échantillons n'ayant aucune activité photosynthétique.....	113

LISTE DES FIGURES

	Page
 Figures	
1. Le système de la pollution atmosphérique.....	3
2. Mesures biophysiques sur le terrain.....	6
3. Diagramme de Jablonski.....	9
4. Morphologie des arbres.....	14
5. Spectre d'absorption de la chlorophylle <u>a</u> et <u>b</u>	41
6. Cinétique d'induction de la fluorescence: effet Kautsky.....	45
7. Schéma d'une cellule photoacoustique.....	51
8. Variation spatiale de la température périodique à l'interface gaz-échantillon.....	55
9. Diagramme schématique du photomètre portatif de photoacoustique et de fluorescence.....	61
10. Signal photoacoustique d'une feuille photosynthétique: hautes fréquences (> 200 Hz).....	73
11. Signal photoacoustique d'une feuille photosynthétique: basses fréquences (<200 Hz).....	75
12. Représentation graphique du délai.....	77
13. Effet de la forme de la modulation sur la valeur de la pente et de l'ordonnée à l'origine du graphique Log-Log (noir de carbone).....	94

14.	Intensité relative des forme de la modulation mesurée par photodiode.....	95
15.	Intensité relative à la forme de la modulation.....	96
16.	Effet de la forme de la modulation sur le rapport signal PA/délai (noir de carbone):onde carrée.....	99
17.	Effet de la forme de la modulation sur le rapport signal PA/délai (noir de carbone):onde triangulaire.....	100
18.	Effet de la forme de la modulation sur le rapport signal PA/délai (noir de carbone):onde sinusoïdale.....	101
19.	Pente du graphique signal PA en fonction du délai selon la forme de modulation.....	102
20.	Effet de la forme de la modulation sur le signal thermique (pois).....	105
21.	Effet de la forme de la modulation sur le stockage d'énergie photosynthétique (pois).....	106
22.	Effet de la forme de la modulation sur le signal d'oxygène (pois).....	107
23.	Effet de la forme de la modulation sur la quantité A_{O_2} normalisée au signal thermique (pois).....	108
24.	Effet du faisceau actinique sur le signal photoacoustique.....	112

25.	Effet de la lumière modulée sur le signal photo-acoustique: basses intensités.....	114
26.	Système pour la mesure du signal photoacoustique à de hautes intensités modulées.....	116
27.	Effet de la lumière modulée sur le signal photo-acoustique: hautes intensités.....	117
28.	Effet du faisceau actinique en fonction de l'intensité de la lumière actinique.....	118
29.	Effet du faisceau actinique en fonction de la fréquence de modulation du faisceau d'analyse.....	120
30.	Effet de l'intensité du faisceau actinique sur le signal photoacoustique.....	122
31.	Effet de l'intensité du faisceau actinique sur le signal photoacoustique: partie linéaire.....	123
32.	Prototype de cellule photoacoustique pour la mesure de température d'échantillons.....	126
33.	Variation de la température de l'échantillon en fonction de l'intensité du faisceau actinique.....	128
34.	Variation du signal photoacoustique en fonction de la température de l'échantillon.....	129
35.	Relation pour le calcul de la constante D à partir du graphique du signal photoacoustique en fonction de l'intensité modulée à différentes intensités de la lumière actinique.....	131
36.	Effet de l'intensité du faisceau d'analyse sur le signal photoacoustique d'une feuille de pois.....	133

37.	Mesures sur le terrain: résultats fluorimétriques.....	136
38.	Mesures sur le terrain: résultats photoacoustiques.....	138
39.	Mesures supplémentaires sur le terrain: résultats fluorimétriques.....	142
40.	Mesures supplémentaires sur le terrain: résultats photoacoustiques.....	144

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

a'	Coefficient de diffusion thermique.
A_{O_2}	Grandeur du vecteur oxygène.
A_{O_2}/A_{pt}	Signal d'oxygène normalisé avec le signal thermique.
A_{pt}	Signal photoacoustique total en présence du faisceau actinique, pris à basses fréquences, sur un échantillon photosynthétique.
ARNEWS	Acid Rain National Early Warning System.
ATP	Adénosine triphosphate.
ATPase	Adénosine triphosphate synthétase.
C	Chaleur spécifique.
C_3	Plantes utilisant le 3-phosphoglycérate dans le cycle d'assimilation du carbone.
CAD	Convertisseur analogue/digital.
c.c.	Courant continu.
Chl a/b	Rapport entre la quantité de chlorophylle <u>a</u> et la quantité de chlorophylle <u>b</u> .
D	Diamètre de la cellule photoacoustique.
d	Temps de délai.
D_0	Constante englobant plusieurs autres constantes.
D_1	Protéine de 32 kDa du photosystème II.
DBMIB	2,5-dibromo-3-méthyl-6-isopropyl- <i>p</i> -benzoquinone.
DCMU	3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée.
D.E.L.	Diode électro-luminescente.
E_{in}	Entrée du modulateur de la D.E.L..

f	Fréquence en Hertz.
F ₀	Accroissement de la température due à la composante de l'état stationnaire de la chaleur absorbée.
F685/F740	Rapport entre l'intensité de fluorescence à 685 nm et l'intensité de fluorescence à 740 nm.
f _d	Fluorescence décroissante.
f _{max}	Maximum de fluorescence.
F mod	Fréquence de modulation du faisceau modulé.
FNR	Ferridoxine NADP réductase.
f _s	Fluorescence stationnaire.
I	Intensité lumineuse.
I ₀	Intensité du faisceau incident.
I _{act}	Intensité du faisceau actinique.
I mod	Intensité du faisceau modulé.
k	Conductivité thermique.
l	Épaisseur.
L	Longueur de la cellule photoacoustique.
M	Signal photoacoustique total.
NADPH	Nicotinamide adénosine diphosphate protonné.
P ₀	Pression atmosphérique.
P680*	Photosystème 680 excité.
PA	Photoacoustique.
PAM	Pulsed-Modulation Fluorometer.
PQ	'Pool' de plastoquinone.
Q	Pression moyenne due au piston acoustique.
Q _a	Plastoquinone a.

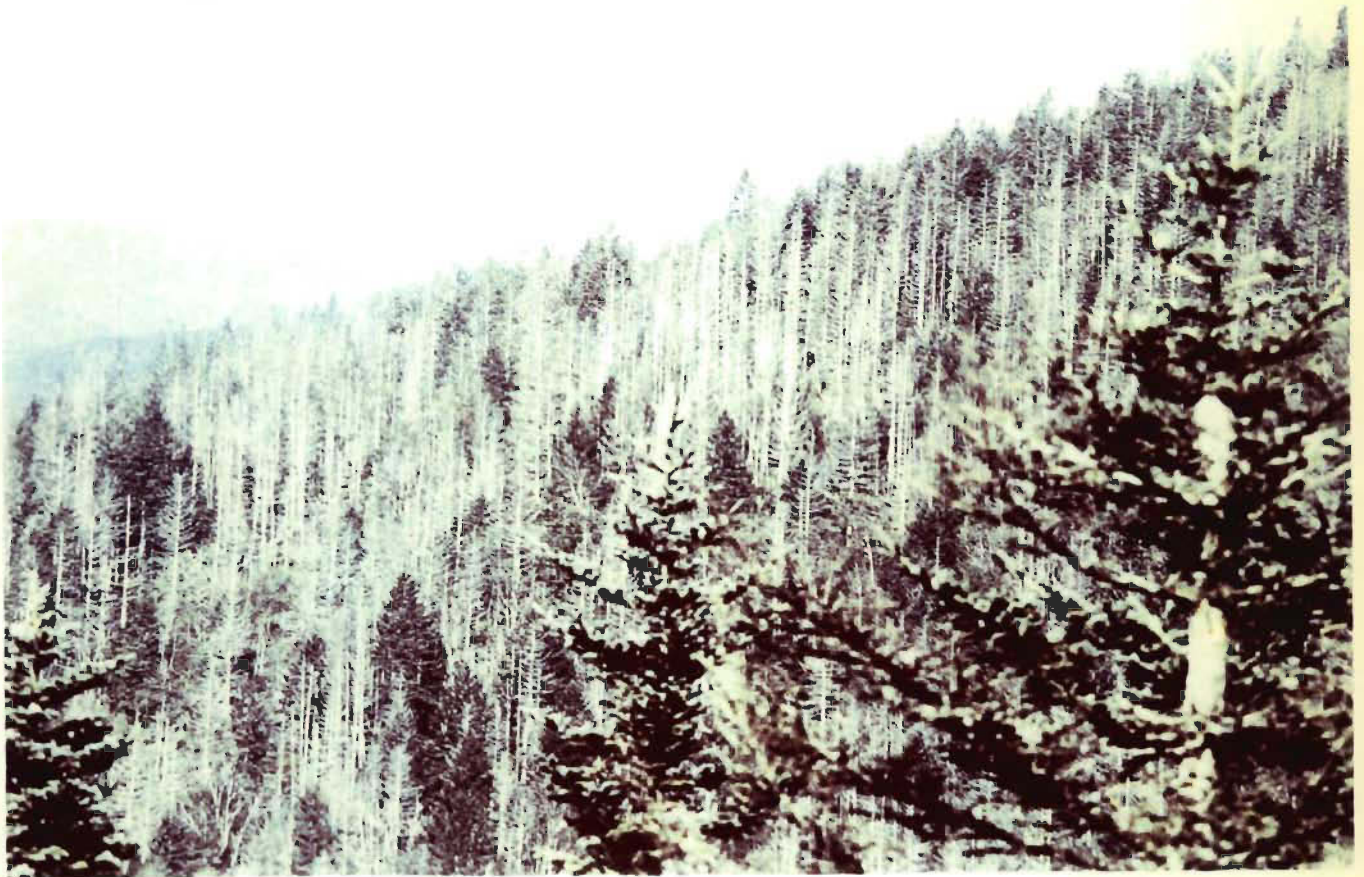
Q _b	Plastoquinone b.
Q _(m)	Signal photoacoustique total obtenu en présence de la lumière modulée, pris à hautes fréquences, sur un échantillon photosynthétique.
Q _(m+a)	Signal photoacoustique total en présence du faisceau modulé et actinique, pris à hautes fréquences, sur un échantillon photosynthétique.
R _c	Signal en cosinus en absence du faisceau actinique.
R _{fd}	Indice de vitalité.
RG	Rosencwaig et Gersho.
rms	Root-mean-square.
rpm	Révolution par minute.
R _s	Signal en sinus en absence du faisceau actinique.
RS232	Port de communication série.
S ₀	Niveau fondamental électronique.
S ₁	Premier niveau singulet d'excitation électronique.
S ₂	Deuxième niveau singulet d'excitation électronique.
S _i	i ième niveau singulet d'excitation électronique (i = 0, 1, 2,..., n).
S.E.P.	Stockage d'énergie photosynthétique.
S/N	Rapport signal-sur-bruit.
t	Temps.
T	Température à la surface de l'échantillon.
T ₀	Température stationnaire à la surface de l'échantillon.
T _{a.c.}	Variation de la température périodique.
T _c	Signal en cosinus en présence du faisceau actinique.

T_e	Température de l'échantillon.
T_s	Signal en sinus en présence du faisceau actinique.
UNECE	United Nations Economic Commission for Europe.
x	Distance, vers l'extérieur, par rapport à la surface.
α	Diffusivité thermique.
γ	Rapport des capacités calorifiques.
β_0	Température ambiante près de la paroi de la cellule.
ε	Coefficient d'absorption optique.
θ	Élévation de température due à la dissipation de l'énergie électromagnétique provenant de transitions non-radiatives.
θ_1	Partie réelle, en phase, de l'amplitude de la température périodique à l'interface solide-gaz.
θ_2	Partie imaginaire, en phase, de l'amplitude de la température périodique à l'interface solide-gaz.
λ_{ex}	Longueur d'onde d'excitation.
μ	Longueur de diffusion thermique.
ρ	Densité.
ϕ	Phase du signal photoacoustique.
ω	Fréquence angulaire.
#	Numéro.
\uparrow	Ouverture de la lumière modulée.
\downarrow	Fermeture de la lumière modulée.
\uparrow	Ouverture de la lumière actinique.

- ↓ Fermeture de la lumière actinique.
- ⌐ Onde carrée
- ∧ Onde triangulaire.
- ~ Onde sinusoïdale.



Forêt de conifères sains. (Alaska)



Forêt de conifères hautement dépéris. (Pennsylvanie)

CHAPITRE I

INTRODUCTION

A. Pollution et dépérissement des forêts

Le sujet d'actualité par excellence depuis les dix dernières années est le problème de la pollution environnementale. Le dépérissement des forêts n'est qu'un problème bien particulier relié à la pollution atmosphérique et ce problème a des retombés socio-économiques très importantes. Le dépérissement des forêts n'est pas entièrement relié à la pollution atmosphérique, car il y a une portion des dommages causés par contact direct avec l'homme et/ou avec une source naturelle, mais cette portion est de loin inférieure à celle provenant directement de la pollution atmosphérique.

La pollution atmosphérique n'est pas un problème local, bien que les sources le soient, mais un problème planétaire. Historiquement, il y a environ 2 000 ans, il y avait déjà de la pollution causée par l'être humain. Des plaintes relatant des problèmes de pollution peuvent être trouvées dans les écritures du poète romain Horace (1). D'autres écritures provenant du treizième siècle font aussi mention de dommages causés à l'architecture et aux statues. Mais il semble que les premiers signes de dommages causés à la végétation furent

enregistrés à Londres par J. Evelyn en 1661. Et la première étude scientifique de dommage direct de la pollution atmosphérique sur la végétation fut publiée par J.H. Stöckhardt en 1871 sur l'effet de la fumée sur le sapin (*Picea*) et le pin (*Abies*) en Allemagne. Bien que les études étaient morphologiques, les dommages étaient bien réels. Mais ce n'est qu'en 1894 que des résultats physiologiques furent publiés par F.W. Oliver qui avait fait une étude sur l'effet du brouillard sur la chlorophylle. Et une autre étude a été faite en Angleterre en 1925 sur l'effet du dioxyde de soufre sur la photosynthèse par J.B. Cohen et A.G. Ruston (1).

La colonisation de l'Amérique du Nord a été suivie de l'industrialisation, donc de la pollution atmosphérique et des problèmes en découlant. Et depuis les dix dernières années, la recherche scientifique fut centrée surtout sur l'impact écologique des précipitations acides et des autres polluants atmosphériques, y compris le problème du dépérissement des forêts. Il y a maintenant aucun doute que la cause première du dépérissement des forêts est directement reliée à la pollution atmosphérique (1,2,3), malgré les paroles prononcées par l'ancien président des États-Unis, Ronald Reagan, qui croyait toujours que le dépérissement des forêts était de causes naturelles.

Le problème réel de la pollution atmosphérique est situé à la source de l'émission du polluant. Mais il y a tout un système entre la source et l'effet sur les plantes. La seule place, dans le système de la

pollution atmosphérique, où on se doit d'agir est au niveau de l'émission anthropogénique. Mais bien que les polluants ne soient pas contrôlables une fois émis, une bonne évaluation de la quantité de polluant ainsi que des dommages causés à la végétation, à partir d'une surveillance étroite et précoce, permettrait aux scientifiques de convaincre les politiciens de légiférer en conséquence sur les normes d'émission des polluants atmosphériques. Le système de la pollution atmosphérique est résumé dans la figure 1.

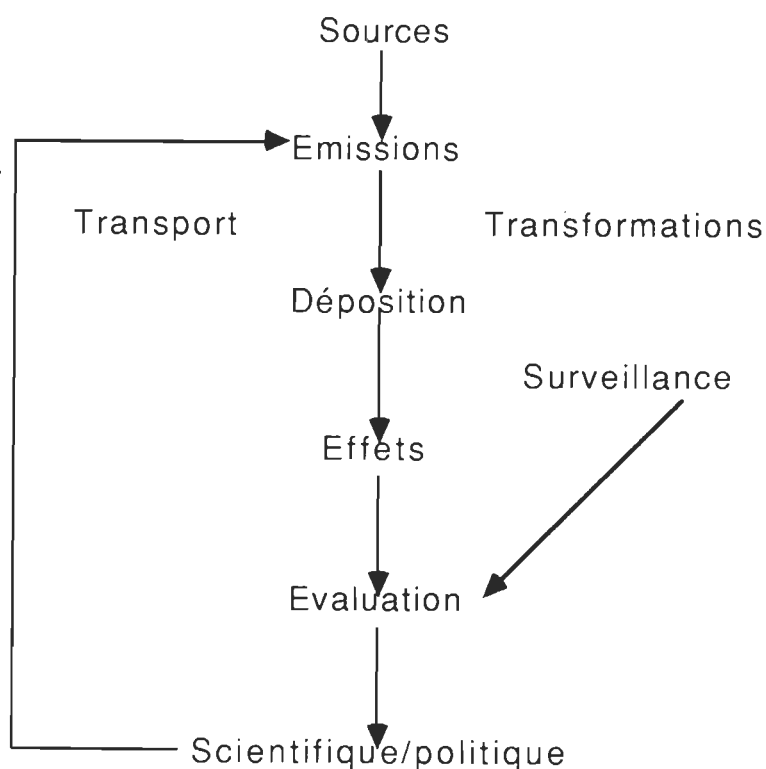


Figure 1: Le système de la pollution atmosphérique.

Pour que la surveillance soit étroite et précoce, il faut se trouver des instruments de mesure qui soient objectifs. Les mesures se feraient au niveau de l'émission, pour déterminer la quantité de polluant rejetée ainsi qu'au niveau du site de la végétation pour une évaluation de l'effet des polluants. Sur le site de la végétation, les mesures se font suivant deux objectifs: i) la quantité de pollution atteignant le site; ii) l'évaluation des dommages des polluants sur la végétation.

La surveillance de la végétation au niveau de l'évaluation du niveau de dépérissement, se fait à l'aide d'instruments de mesure et de méthodologies scientifiques prédéterminées. Ces instruments de mesure sont très différents les uns des autres, c'est-à-dire de l'examen visuel (4,5) à la mesure de l'activité photosynthétique (6). Les instruments subjectifs, comme celui de UNECE (United Nations Economic Commission for Europe) (4) ou celui de ARNEWS (Acid Rain National Early Warning System) (5), comportent une grande erreur au niveau du résultat car celui-ci dépend fortement du jugement de l'expérimentateur. De plus, lorsqu'il y a constatation visuelle, il est souvent trop tard pour que l'on puisse agir pour récupérer l'activité photosynthétique de la végétation. Par contre, avec les méthodes objectives instrumentales, il est possible de mesurer directement l'activité photosynthétique, comme par exemple avec la mesure du stockage d'énergie ou celle du dégagement d'oxygène. Donc en employant de telles méthodes, il est possible de mesurer l'effet de polluants atmosphériques sur l'activité végétale avant même qu'il y

ait constatation visuelle de dégâts. De plus, ces méthodes doivent être rapides, précises et sans aucune intervention humaine dans le processus d'acquisition des données de l'activité photosynthétique de la plante analysée.

B. Mesures de la photosynthèse sur le terrain

Les mesures sur le terrain sont une partie très importante de la recherche en photosynthèse. Ces mesures peuvent être effectuées sur les feuilles, la plante entière ou sur une partie d'une forêt. Toutes les méthodes biophysiques et/ou physiologiques se situent au niveau de la feuille ou d'une petite partie de la plante tandis que les mesures sur la plante entière ou sur une partie d'une forêt utilisent les méthodes dites morphologiques (i.e. défoliation, couleur des feuilles, mesures linéaires des différentes parties de la plante, etc).

Les mesures biophysiques sont liées aux phénomènes d'irradiation solaire sur la plante (figure 2). L'énergie lumineuse peut être soit absorbée par les pigments de la feuille ou soit réfléchiée. S'il y a absorption de l'énergie photonique, il y a alors plusieurs processus de désactivation et/ou de transfert énergétique, conduisant possiblement au travail photochimique.

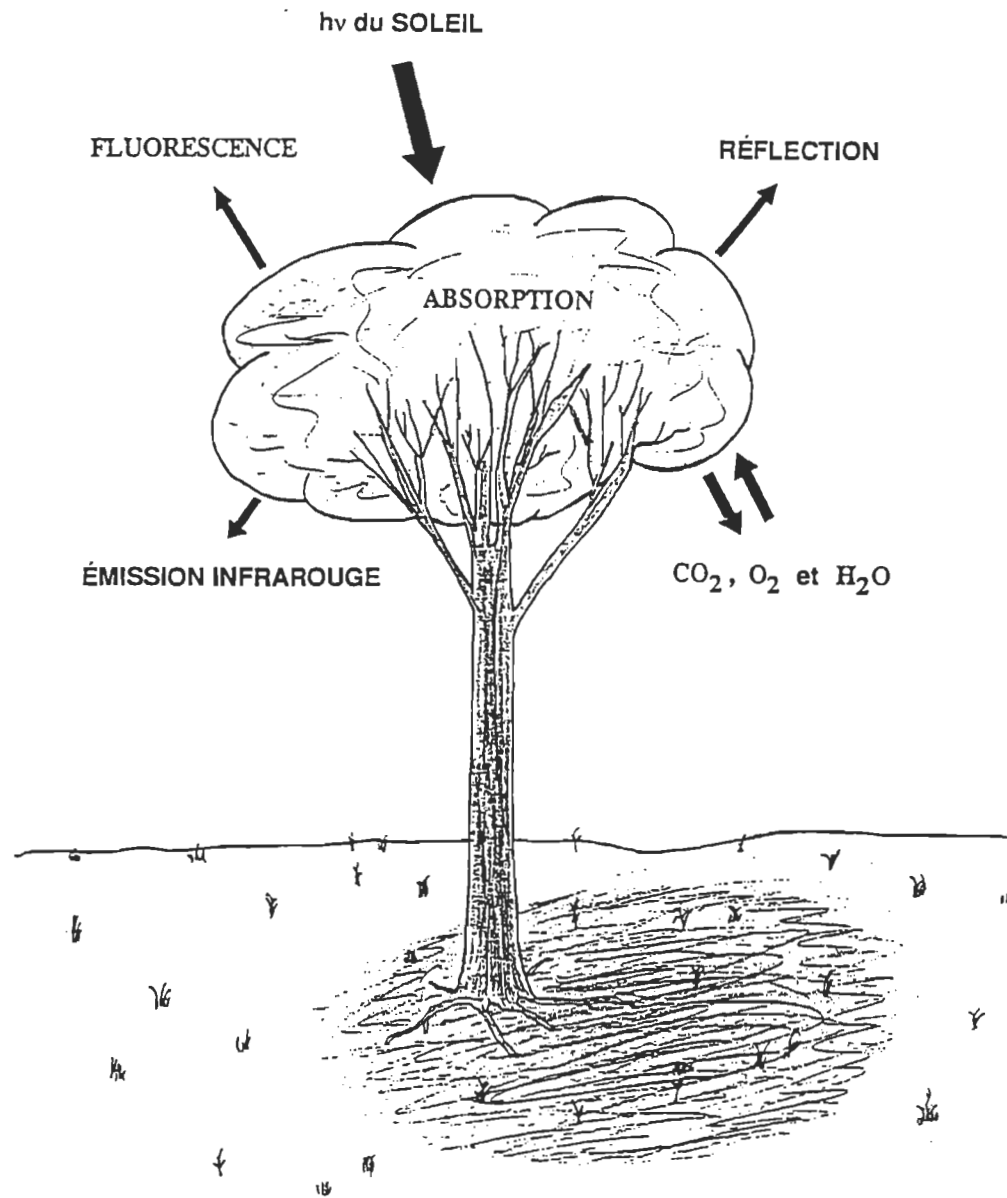


Figure 2: Mesures biophysiques sur le terrain.

Chez une plante saine, l'énergie électromagnétique est absorbée par la chlorophylle a, b et autres pigments accessoires tels que les caroténoïdes. La plante étant saine, le transfert d'énergie s'effectue sans problème. Ce transfert énergétique se fait entre les différents pigments vers les centres photochimiques, c'est-à-dire le photosystème II et le photosystème I, qui reçoivent l'énergie et l'utilisent pour effectuer le travail photochimique; la production d'oxygène et la production de ATP. Une molécule d'oxygène est produite, à partir de deux molécules d'eau, par le photosystème II. Ceci se passe au niveau des quatre atomes de manganèse après que la séparation de charge entre le P680* et la phéophytine s'effectue, et que Qa et Qb soient réduits. L'oxygène est alors relâché dans l'atmosphère. L'ATP est produit au niveau de l'ATPase qui est située après le photosystème I. L'ATPase fonctionne selon la théorie de Mitchel. Cette théorie prédit que c'est par un courant d'électrons transmembranaire, perpendiculaire au transfert de proton pompé par l'ATPase d'un côté à l'autre de la membrane, que l'ATPase peut effectuer la réaction menant à la production d'ATP. Une molécule de NADPH sera produite par le complexe FNR, qui reçoit les électrons du photosystème I, et le NADPH est réduit. L'ATP sera utilisé pour le processus de la fixation du carbone dans le cycle de Calvin. Entre les deux extrémités de la chaîne de transport d'électrons, il y a le stockage d'énergie sous forme de transfert électronique. La partie de la photosynthèse où se fait la production d'oxygène et d'ATP se nomme la phase lumineuse (ou physico-chimique) et est située à l'intérieur du chloroplaste, et elle se fait en présence de lumière. Quand à la

fixation du carbone, c'est la phase obscure (ou enzymatique) de la photosynthèse (cycle du carbone ou cycle de Calvin) et elle se fait aussi en présence de lumière.

Donc, la majeure partie de l'énergie lumineuse qui sera absorbée, sera utilisée et transformée pour le travail photochimique, et la portion restante sera ré-émise à un plus bas niveau d'énergie sous forme d'émission de fluorescence et de chaleur.

Dans le cas de la fluorescence, l'émission de lumière provient en majeure partie des chlorophylles a associées au photosystème II, et l'autre partie par les chlorophylles a associées au photosystème I. L'émission de lumière ou de chaleur se fait après excitation de la molécule de chlorophylle à un niveau supérieur (S_1 ou S_2) à S_0 , selon la longueur d'onde d'excitation utilisée (la lumière rouge excite à S_1). Après conversion interne, c'est-à-dire un changement de niveau vibrationnel de la molécule, ce qui est suivi de l'émission de chaleur, il peut y avoir un transfert de l'état singulet (S_i) à l'état singulet (S_1) ou triplet (T_1) correspondant. Par la suite il y a un transfert entre l'état triplet et l'état fondamental (S_0) avec une émission photonique de moins grande énergie que le photon ayant été absorbé, au départ, par la molécule de chlorophylle. Si le transfert se fait de S_1 à S_0 c'est la fluorescence tandis que le transfert de T_1 à S_0 est appelé la phosphorescence. Le diagramme de Jablonski (figure 3) résume bien les différents processus de désexcitation d'une molécule après absorption photonique.

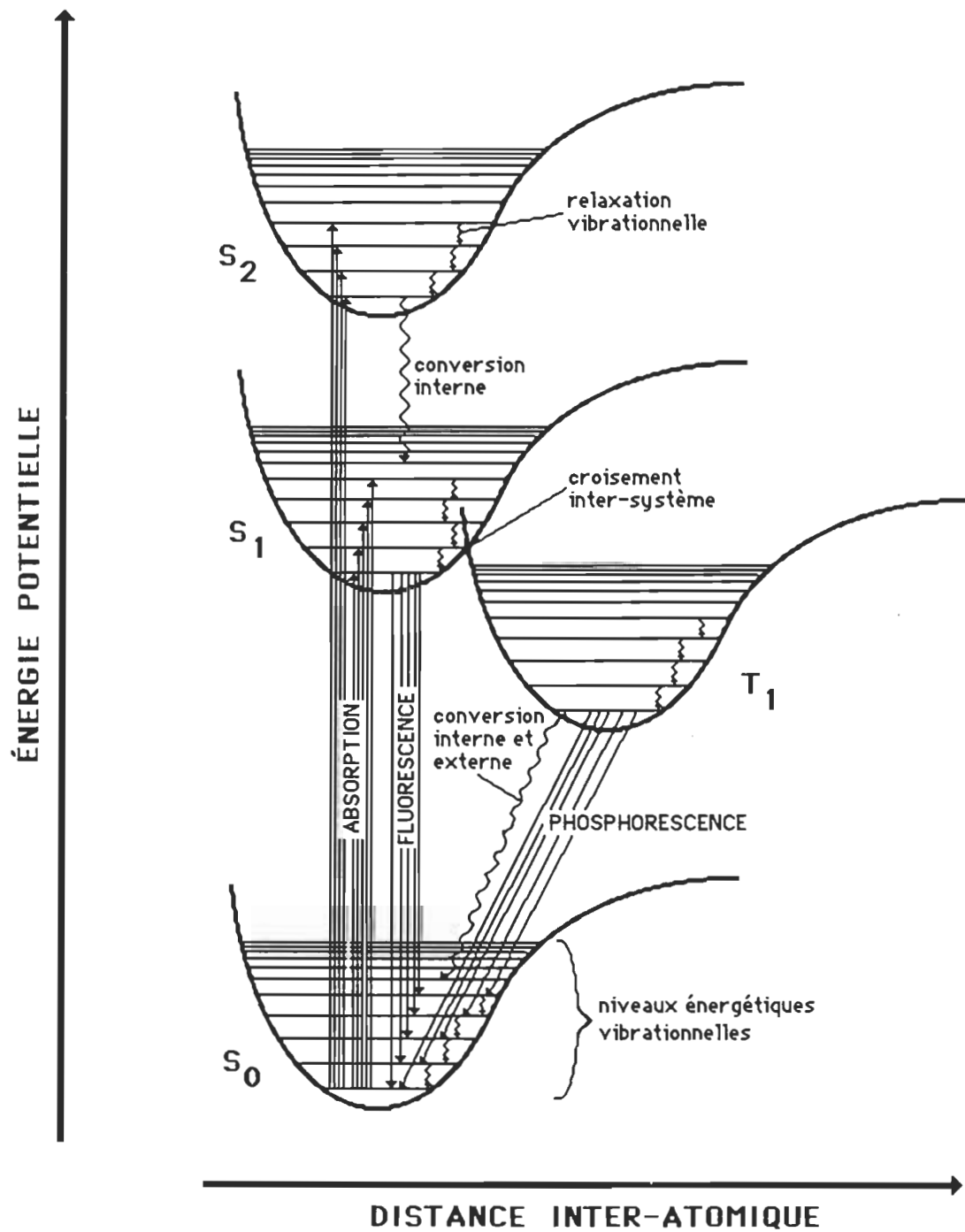


Figure 3: Diagramme de Jablonski.

Comme on peut le constater, chez les feuilles, tout est relié à la phase lumineuse de la photosynthèse. Il est même possible d'inclure les échanges en gaz carbonique, car la fixation du carbone dépend de la quantité de NADPH disponible. Il en est de même pour les échanges en eau, car la quantité d'oxygène produite déterminera la demande en eau arrivant au photosystème II. Donc, tous les résultats biophysiques mesurés sur les feuilles, seront fonction de la lumière incidente.

Si un polluant atmosphérique attaque la feuille ou la plante, les processus photosynthétiques seront affectés (3). Et donc la mesure de l'activité de la phase lumineuse donnera des résultats plus représentatifs des dommages, car la phase lumineuse est le coeur de la photosynthèse.

C. État de la recherche

1. Des appareils portatifs pour la mesure de la photosynthèse sur le terrain

Il est évident que pour mesurer la photosynthèse sur le terrain, il faut utiliser un système qui possède des caractéristiques particulières, p. ex. portatif, résistant, sensible et autonome (selon la technologie disponible).

Les mesures antérieures sur le terrain furent divisées en deux grands groupes: les mesures morphologiques et physiologiques (*tableau 1*), et les mesures reliées directement à la détection de lumière (*tableau 2*).

Les mesures morphologiques sont reliées directement à la forme et à la structure de la plante. Ce type de mesure fut beaucoup utilisé pour déterminer le rendement en agriculture ou pour mesurer l'effet d'un stress environnemental sur la récolte. Les données physiologiques renseignent sur les fonctions organiques de l'espèce analysée. Ces renseignements donneront donc directement la vitalité de la plante. Les mesures physiologiques sont effectuées sur le tronc ou sur les feuilles. Dans le tronc, la seule partie qui peut renseigner sur la vitalité de la plante est la zone cambiale vasculaire (7). Cette zone est située entre l'aubier et l'écorce (figure 4) et est constituée surtout de cellules vivantes. La mesure de la résistivité dépend surtout de la présence d'ions mobiles, principalement du potassium. Cette mesure se fait entre deux électrodes introduites dans l'écorce. La mesure de la résistivité se fait sur tout ce qui se trouve entre les deux électrodes. C'est-à-dire que la mesure comprendra la résistivité du cambium et de la partie conductrice du phloème et du xylème de part et d'autre du cambium.

Tableau 1

Mesures antérieures sur le terrain: première partie.

- MORPHOLOGIQUE
 - grandeur de la tige
 - grosueur de la feuille
 - poids sec et humide
 - évaluation foliaire

- PHYSIOLOGIQUE
 - résistivité et capacité électrique du cambium
 - technique oscilloscopique

ECHANGES GAZEUX

- | | |
|--------|--|
| O_2 | <ul style="list-style-type: none"> -électrode de type Clark -mesure polarographique -pression partielle |
| CO_2 | <ul style="list-style-type: none"> -analyse par infrarouge -analyse isotopique -détermination du pH |
| H_2O | <ul style="list-style-type: none"> -transpiration et évaporation -résistivité (conductivité) des stomates à la diffusion |

Tableau 2

Mesures antérieures sur le terrain: deuxième partie.

LUMIÈRE INCIDENTE

- LUMIÈRE RÉFLÉCHIE
 - spectre de réflexion (FR/R)
 - densité photonique

LUMIÈRE ABSORBÉE

- ABSORPTION
 - spectre d'action
 - dosage de la chlorophylle

LUMIÈRE ÉMISE

- FLUORESCENCE
 - fluorescence de la chlorophylle
- INFRAROUGE
 - mesure de température
 - radiométrie photothermique

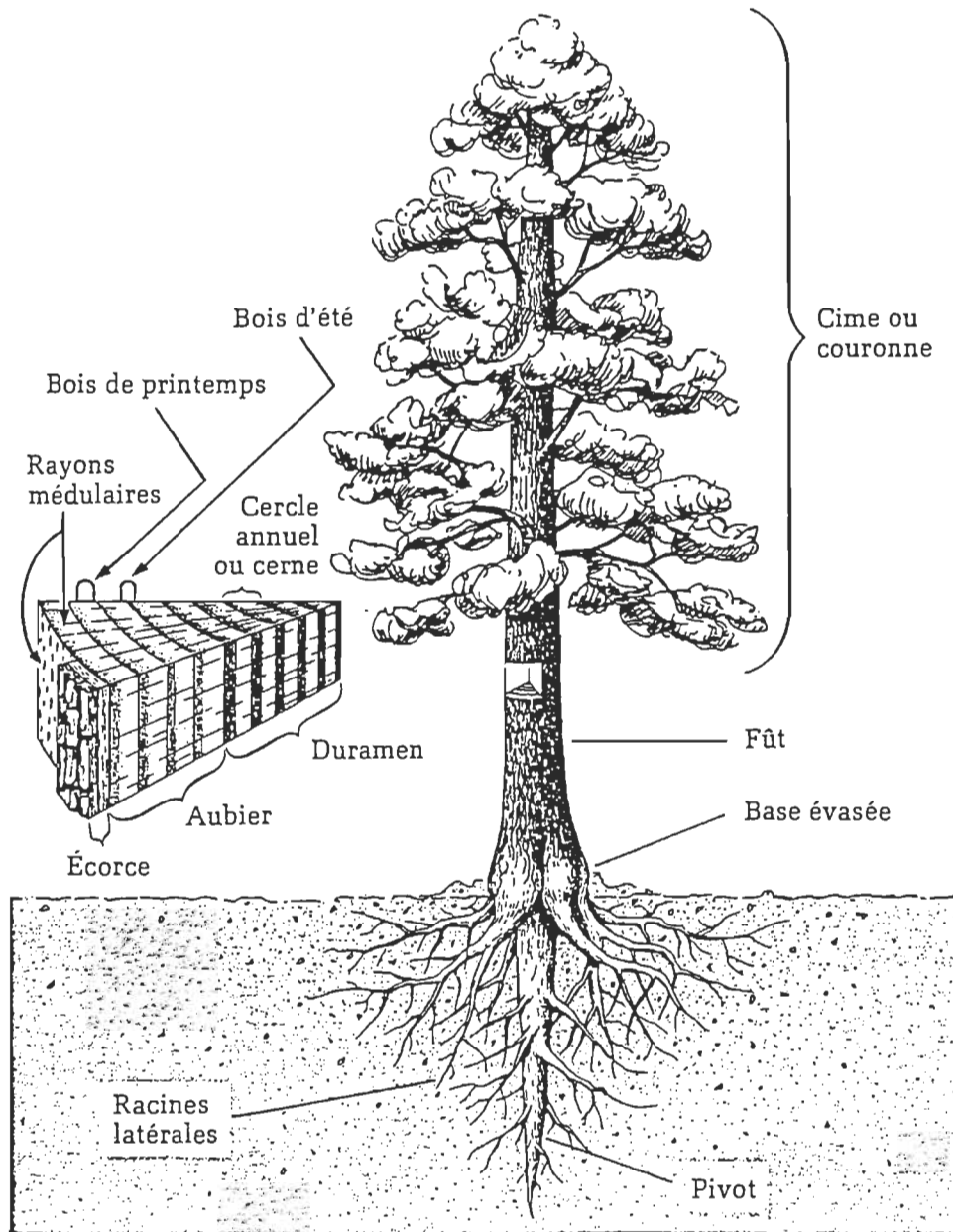


Figure 4: Morphologie des arbres.

La mesure de la capacité électrique du cambium se fait avec les mêmes électrodes que pour la mesure de la résistivité (7). Cette mesure est beaucoup moins affectée par la variation journalière de la température. La capacité électrique du cambium est reliée à la quantité d'ions présent dans la zone cambiale vasculaire, mais elle dépend surtout de la polarisation des surfaces membranaires. La mesure de la capacité du cambium est proportionnelle à la vitalité de l'arbre, tandis que la résistivité électrique du cambium est inversement proportionnelle à sa vitalité.

La technique oscilloscopique est différente des deux précédentes, mais s'effectue dans la même région de l'arbre. La méthode exige l'introduction de quatre aiguilles; ces sondes sont très près les unes des autres (7 mm). Une onde carrée (1000 Hz) est générée entre deux des électrodes et est détectée par les deux autres aiguilles. Selon la forme de l'onde enregistrée, il est possible de distinguer entre un tissu végétale actif, un tissu en phase de dormance et un tissu mort.

La détection des échanges gazeux est aussi considérée comme étant une mesure physiologique. Ce type de mesure peut donner de l'information sur le rendement de la photosynthèse. Bien entendu, ce type de mesure, sur le terrain, se fait où il y a présence de chloroplastes.

Dans le passé, le dégagement d'oxygène fut mesuré de différentes façons. La méthode la plus employée a été l'utilisation de l'électrode de type Clark. Bien avant que L.C. Clark Jr. (1956) ne mit au point son électrode fait de platine, de KCl et d'argent, différents chercheurs avaient déjà mesuré le dégagement d'oxygène. Le dégagement d'oxygène par les plantes vertes avait été découvert bien avant que les scientifiques la mesure à l'aide d'un dispositif instrumental. Joseph Priestley, en découvrant l'oxygène en 1774, avait remarqué que les plantes relachaient de l'oxygène en présence de lumière. Il écrivit que lui et une souris blanche étaient les seuls êtres vivants à avoir respiré de l'oxygène pur. En 1937, R. Hill avait mesuré l'évolution d'oxygène avec des chloroplastes isolés par mesures spectrophotométriques.

L'électrode de type Clark a été améliorée par T. Delieu et D.A. Walker en 1972 (8). Le principe est relativement simple; il s'agit en fait d'une mesure potentiométrique entre une anode d'argent et une cathode de platine, un pont de KCl reliant les deux électrodes. Ce montage est séparé de la solution, contenant les chloroplastes, par une membrane perméable à l'oxygène. L'oxygène, arrivant sur l'électrode, est réduit à l'électrode de platine, et la quantité d'oxygène réduit est proportionnelle au courant mesuré. Un échantillon de feuille, placé dans une cellule hermétique, dégage de l'oxygène lorsqu'il est illuminé. Le changement de concentration d'oxygène dans

l'enceinte est alors mesuré avec l'électrode de type Clark. Ce type d'électrode est maintenant commercialisé par la compagnie Hansatech Limited (Norfolk, England).

La deuxième méthode pour mesurer le dégagement d'oxygène est la détermination polarographique. À la suite de la mesure du dégagement d'oxygène, avec des chloroplastes, par Delieu et Walker (8), en 1967, avec une électrode vibrante de platine brillant, il a transporté sa technique pour la mesure sur le terrain de la photosynthèse. En 1989, il fit des mesures sur le terrain, sur des feuilles, du dégagement d'oxygène en fonction de l'intensité lumineuse de diodes électroluminescentes, dans une enceinte hermétique (9).

Une autre méthode fut utilisée pour la détermination de l'oxygène chez les plantes, soit la mesure de la pression partielle de l'oxygène. En 1955, M.B. Allen mesura la pression du gaz dégagé par des chloroplastes (8,9), et il fut démontré, à l'aide de bactéries bioluminescentes (8,10), qu'il s'agissait d'oxygène. Cette technique utilisant l'électrode de type Clark fut reprise et modifiée par une autre équipe pour la mesure de l'oxygène sur des algues (11). Le problème de cette technique est que celle-ci se fait dans l'eau. Ce type de mesure n'est donc pas effectuée dans les meilleures conditions physiologiques pour un échantillon de feuille provenant d'une plante terrestre.

Le deuxième gaz qui est très important, en photosynthèse, est le bioxyde de carbone. Ce gaz est important, car il est l'apport de carbone dans le cycle de Calvin, en l'occurrence la conversion du bioxyde de carbone en hydrate de carbone. En 1945, Melvin Calvin, prix Nobel de chimie (1961), commença l'étude de cette partie de la photosynthèse avec le carbone-14 comme outil principal. Et en 1962, il publia le cycle complet du carbone (12,13).

Le bioxyde de carbone, absorbé de l'atmosphère, est utilisé pour former plusieurs produits de biosynthèse, mais les produits du cycle de Calvin sont les trioses phosphate (i.e., 3-phosphoglycéraldéhyde), le sucrose et l'amidon. Le sucrose, un disaccharide, est utilisé comme source de carbone et d'énergie pour la plante, tandis que l'amidon est le réservoir en hydrate de carbone. Une partie des trioses phosphate passe du chloroplaste vers l'extérieur, pour être ensuite utilisée à la construction des parois cellulaires et à la synthèse de plusieurs autres produits. De plus, l'amidon et le sucrose sont aussi une source d'énergie pour le processus de la respiration chez les plantes (dégagement de bioxyde de carbone et absorption d'oxygène). Il faut bien comprendre que même si le cycle de Calvin est aussi nommé 'phase obscure de la photosynthèse', il est photodépendant. La réaction qui produit l'ATP, produit pour la fixation du bioxyde de carbone ainsi que pour la production de sucres, n'a lieu qu'en présence de lumière. Les stomates, à la surface des feuilles, se

ferment à la noirceur et donc l'apport en gaz carbonique de l'atmosphère est coupé. Plusieurs enzymes du cycle de réduction du carbone, cycle de Calvin, sont régis par la lumière. Ainsi, plusieurs enzymes ne sont actifs qu'à la lumière, d'autres beaucoup moins ou pas du tout, et certains seront totalement désactivés à la noirceur (14). Donc, comme l'oxygène est le gaz le plus important de la phase lumineuse de la photosynthèse, le bioxyde de carbone l'est tout autant pour les réactions du cycle de Calvin.

La détection du bioxyde de carbone a été vraiment la méthode la plus employée pour la mesure de la photosynthèse. Certains instruments utilisent le principe de la spectroscopie d'absorption dans l'infra-rouge comme détecteur, d'autres un compteur de particules radioactives, ou encore une simple électrode à membrane de verre type pH. Les deux premières méthodes utilisent une détection en phase gazeuse, l'autre en milieu aqueux.

Au sujet de la méthode spectroscopique infra-rouge, la mesure s'effectue à la fréquence de vibration $C=O$. L'échantillon de feuille est placé dans une enceinte hermétique. Une pompe à gaz amène un aliquot d'air de la chambre hermétique à la cellule à gaz du photomètre infra-rouge, et la quantité de bioxyde de carbone, dans l'échantillon de gaz, sera proportionnelle à l'absorbance dans le gaz. Si la feuille est éclairée avec une

source de lumière pour activer la photosynthèse, alors la concentration en bioxyde de carbone variera. L'activité photosynthétique apparente est alors calculée (15,16).

Le principe des cellules ouvertes est légèrement différent. Au lieu d'injecter de petites quantités de bioxyde de carbone, l'air est pompé (atmosphérique ou en bombonne) dans la chambre à échantillon. La quantité de bioxyde de carbone dans la chambre est calculée, par différence, après analyse du gaz, avec le détecteur infra-rouge, à $4,26\text{ }\mu\text{m}$, à l'entrée et à la sortie de la cellule (17). La compagnie LI-COR Inc. (Nebraska, USA) vend un appareil portatif portant le numéro des modèles LI-6000 et LI-6200.

Quant à la détection isotopique, il faut injecter une petite quantité de bioxyde de carbone radioactif dans l'enceinte hermétique. L'isotope utilisé pour les mesures sur le terrain est le carbone-14. Par simple différence de la quantité, avant et après injection, il est facile de déterminer la quantité de bioxyde de carbone ayant été absorbée par la feuille. Le détecteur est du type Geiger-Müller (18).

L'autre méthode de travail avec le carbone-14, qui a été beaucoup utilisée, est la détection de la quantité de carbone radioactif, absorbée par l'échantillon de feuille, avec un spectromètre à scintillation. Sur le terrain, la feuille est

placée dans une chambre hermétique. Le mélange d'air contenant le bioxyde de carbone radioactif est introduit dans la chambre. L'échantillon absorbe alors le gaz radioactif. Après un certain temps d'incubation dans le gaz, la feuille est coupée et placée dans une solution de solubilisation. En laboratoire la feuille est digérée, et par la suite la quantité de carbone radioactif est dosée. Le rendement photosynthétique peut alors être calculé (19,20).

Il est à noter qu'il existe un problème majeur dans l'utilisation de la technique en phase gazeuse. En effet, la variation de la température influence la mesure expérimentale. La loi des gaz nous montre bien que le volume du gaz varie en fonction de la température, donc la concentration mesurée de l'espèce est aussi influencée. Pour effectuer ce type de mesure, il faut donc avoir un très bon contrôle sur ce paramètre (21). Le deuxième inconvénient est l'utilisation d'un isotope radioactif, p. ex. dans le cas de la méthode avec le carbone-14.

La détection avec électrode à membrane de verre de type pH est fort différente. La méthode est basée sur la solubilité du bioxyde de carbone dans l'eau, ainsi que sur l'absorption du gaz carbonique dissout. Cette méthode s'emploie avec des algues ou des chloroplastes isolés. Le principe est le suivant. La feuille absorbe le bioxyde de carbone dissout dans l'eau. Donc le pH de la solution (eau) augmentera. En ajoutant à l'eau une solution

contenant du bioxyde de carbone (eau enrichie en bioxyde de carbone), le pH de l'eau retournera à sa valeur initiale. En connaissant la quantité de titrant ajoutée, nous déterminons ainsi la quantité de gaz carbonique absorbée par la plante (11). Ce type de mesure ne peut être employé que sur des chloroplastes isolés ou des algues. De plus, la détermination de la concentration d'un gaz dissout introduit beaucoup d'erreur dans les résultats.

Le troisième composé en importance, chez la plante, est l'eau. Bien que l'eau se retrouve à l'état liquide dans les végétaux, il y a une grande partie de cette eau qui s'évapore des feuilles. Ce processus d'évaporation est très important car il régularise la quantité d'eau dans la feuille, ainsi que la température interne de la feuille. Si l'un de ces deux paramètres change drastiquement, alors c'est la fin de la photosynthèse pour cette feuille, et à la limite, pour la plante. L'évaporation de l'eau se fait par les stomates qui sont les pores de la feuille. Si le rendement photosynthétique est maximal chez la feuille, alors les stomates s'ouvriront ou se fermeront selon la quantité d'eau dans la feuille, de la température de la feuille, ou de la quantité de lumière atteignant la feuille. De plus, à certaines concentrations de polluant, les stomates des feuilles se ferment, protégeant ainsi l'intérieur de la feuille.

Donc chez une feuille où les stomates sont affectées, la vitesse d'évaporation ou la résistivité des stomates à la diffusion de l'eau sera différente par rapport à une feuille saine. La détermination de la fonctionnalité des stomates, à l'aide de mesures faites sur la quantité d'eau dans la chambre, est un outil intéressant.

La mesure de la transpiration et de l'évaporation, ainsi que de la résistivité des stomates à la diffusion de l'eau est relativement simple. La feuille ou un échantillon de feuille, est placée dans une enceinte où la température est contrôlée. L'humidité de l'air à l'entrée de la cellule est pré-déterminée. La valeur mesurée, servant au calcul, est la différence d'humidité entre l'air entrant dans la cellule, et celui dans la cellule. La mesure de la quantité d'eau peut se faire avec un hygromètre (22), un condensateur sensible à l'humidité (17,21,23) ou un spectromètre infra-rouge à 2,59 μm (24).

Les mesures reliées directement à la détection de lumière sont résumées au tableau 2. Concernant la mesure de la lumière incidente et réfléchie, on retrouve deux méthodes: le spectre de réflexion et la densité photonique.

Toute la lumière entre 350 nm et 725 nm est photosynthétiquement active. Trois régions du visible, soit dans le bleu (400-550 nm), dans le rouge (550-700 nm) et dans le rouge

lointain (700-800 nm), ont un effet sur la morphologie de la plante. Les caroténoïdes, les chlorophylles et les xanthophylles absorbent dans le bleu tandis que les chlorophylles a et b absorbent dans le rouge. La lumière dans le rouge et le rouge-lointain contrôle la photoconversion du phytochrome qui régularise la grandeur de la tige, la forme de la feuille, l'épaisseur de la feuille, la concentration en chlorophylle, ainsi que la structure du chloroplaste, incluant le nombre et la grosseur des granas et du rapport Chl a/b. La mesure du rapport de l'intensité de la lumière dans le rouge-lointain (FR) et rouge (R) atteignant la plante peut être mise en relation avec la quantité de biomasse produite (25) ou le contenu en chlorophylle (26). Plus le rapport FR/R est grand, plus la tige de la plante sera grande ainsi que le contenu en chlorophylle. Mais le rapport Chl a/b diminuera en fonction de l'augmentation du rapport FR/R. D'autres auteurs utiliseront le spectre complet de réflexion pour la comparaison entre les différentes bandes (27)

Il est évident que la quantité de lumière est très importante en photosynthèse. La densité photonique de la lumière parvenant à la plante fut surtout utilisée en relation avec d'autres types de mesures. La densité de photons atteignant la feuille fut mise en corrélation avec des mesures d'échange de bioxyde de carbone (28), de transpiration et de conductivité foliaire à la vapeur d'eau (29).

Quant à la spectroscopie d'absorption, il est possible d'obtenir des renseignements sur les pigments présents ainsi que sur leurs quantités. Pour les spectres d'actions, la spectroscopie d'absorption est utilisée. Mais le dosage de la quantité de chlorophylle est une valeur beaucoup plus importante, car la quantité de chlorophylle représente la fonctionnalité du chloroplaste (30). Sur le terrain, le spectre d'absorbance d'une feuille est déduit, par calcul, à partir du spectre de réflexion et celui de transmittance. Un des rares spectrophotomètres portatif est celui de LI-COR Inc. (Nebraska, USA) portant le numéro du modèle LI-1800. En Europe, le spectrophotomètre Shimadzu UV 200S (Ulbricht Kugel) est employé sur le terrain (31).

Le troisième type de photon détectable est celui provenant de la feuille. Cette émission de lumière est mesurable par spectroscopie de fluorescence ou par spectroscopie infra-rouge. Une feuille qui est excitée dans le visible, à environ 470 nm, émettra dans le rouge (685 nm) et proche infra-rouge (740 nm). Cette partie du spectre d'émission provient de la fluorescence de la chlorophylle. En plus de l'émission de photons dans le visible, l'échantillon émettra aussi de la chaleur. Cette partie d'émission provient des désexcitations non-radiatives ou conversion interne des molécules excitées. La détection de photons émis par la feuille est une mesure simple, rapide et précise.

La détection de la fluorescence se fait à l'aide d'un détecteur sensible dans la région du visible. Une simple photodiode peut être employée pour détecter l'émission de photons dans la région spectrale vers 685 nm. Ce type de mesure est toujours très utilisé. Certains ont fabriqué leur propre appareil portatif (32), tandis que d'autres ont acheté un appareil commercial (33). La mesure de la fluorescence peut même être faite par avion (34). Une description plus complète concernant la technique de la fluorescence se trouve à la section C.2.

La mesure de l'émission de chaleur peut se faire par plusieurs méthodes. La méthode la plus directe, mais la moins précise, est l'utilisation d'un thermomètre, d'un thermocouple ou d'une thermistance. Dans ce cas, la sonde doit être en contact avec l'échantillon. La deuxième méthode est la détection par photométrie de l'intensité de chaleur émise, avec un détecteur infra-rouge et un filtre laissant passer la longueur d'onde de $10\mu\text{m}$ (35). L'avantage de cette technique est qu'il n'y a aucun contact physique avec la feuille. L'analyse peut donc s'effectuer sur une feuille toujours attachée à l'arbre. La dernière méthode pour mesurer la chaleur émise par une feuille est celle de la spectroscopie photoacoustique.

La description de la technique sera expliquée dans la section C.3, mais en ce qui concerne la spectroscopie photo-

acoustique et les mesures réelles sur le terrain, il n'existe à ce jour qu'un seul montage. Cet appareil portatif utilise une cellule ayant une configuration ouverte, et un détecteur piézoélectrique (36). Donc l'analyse quantitative de la radiation infra-rouge d'une feuille non-détachée peut être faite. En spectroscopie photoacoustique conventionnelle (i.e. cellule hermétique et un microphone comme détecteur), il est possible de mesurer la quantité de chaleur émise par un échantillon de feuille (37), mais aussi l'oxygène dégagé (6).

2. De la fluorescence

L'émission de lumière, par des objets inertes ou vivants, est un phénomène qui, aujourd'hui, est bien connu et compris. Mais ce même phénomène était, autrefois, associé à la sorcellerie et au démon.

Il est évident que l'émission de lumière est associée à une émission de photons du corps fluorescent ou phosphorescent. Il est aussi évident que tous les corps qui sont excités émettront de la lumière (i.e. infra-rouge, visible, ultra-violet ou rayonnement X). Le meilleur exemple d'un corps excité qui émet de la lumière, est le soleil. Les atomes d'hydrogène, d'hélium et d'autres éléments plus lourds sont excités par les réactions termo-nucléaires et émettent de la lumière après désexcitation.

Donc l'émission de lumière de tout corps est compréhensible, dans la mesure où il y a des atomes ou molécules excités.

Il y a plusieurs millénaires, cette réalité n'était pas évidente, mais un sujet controversé. La conception de l'origine de la lumière était la suivante: la lumière provenait de l'oeil. La conception même du photon était encore plus sombre. Empédocle prétendait que la lumière provenait de l'oeil, et c'est ce que l'on pouvait lire dans le *Timée*. Cinq cents ans plus tard, Démocrite, qui naquit en 460 avant Jésus-Christ, écrivit que '...Ce que nous appelons la lumière est constitué par des atomes émis par un corps lumineux, laissant une impression de lumière dans notre oeil dès qu'il le rencontre...'. Démocrite avait eu comme maître, Leucippe, le véritable inventeur de l'atomisme. Par la suite, Aristote énonça que chaque corps lumineux exerçait une certaine influence sur un milieu omniprésent transmettant et guidant la lumière vers notre oeil. Par la suite, le poète romain Lucrèce écrivait que l'image de chaque corps était en fait un genre de peau très mince se détachant de la surface de l'objet. Dans l'Antiquité ils en arrivèrent à l'hypothèse que la face des corps émettait des corpuscules reproduisant la surface de toutes choses. Cependant, le principe qui est encore vrai aujourd'hui, et qui fut dit en ce temps, est que la lumière se propage à une vitesse inexprimable, la plus grande vitesse existant dans la nature (38).

Aujourd'hui, on sait d'où provient la lumière et ce qu'elle est, mais aussi que plusieurs substances suite à une excitation, par l'une ou l'autre longueur d'onde du spectre électromagnétique du soleil, peut, par la suite, émettre de la lumière. C'est le phénomène de la luminescence, incluant phosphorescence et fluorescence.

L'observation de ce phénomène n'est pas nouveau. En effet, il y a environ mille ans, l'empereur de Chine possédait un tableau. Cette oeuvre était surnommée 'le tableau magique'. Chaque soir un boeuf apparaissait sur la peinture. On ignore la composition de la peinture mais c'est le premier exemple de l'histoire d'un matériel qui restituait de la lumière (39).

Le procédé de synthèse d'une substance émettant de la lumière fut trouvé par erreur par un cordonnier de Bologne, à la fin du seizième siècle. Vincencio Casciarolo faisant de l'alchimie comme passe temps avait chauffé une pierre, pensant y recueillir de l'or mais au lieu de trouver le métal précieux, il trouva que la pierre émettait une lueur rougeâtre dans l'obscurité. La pierre de Bologne fut nommée 'pierre de lune' ou encore 'porte-lumière', en latin *licifer* et en grec *phosphor*, d'où le mot *phosphorescence* pour désigner la propriété des corps qui émettent de la lumière après avoir été éclairés. Cette pierre fut aussi surnommée 'éponge à lumière', mais ce terme n'était pas exact et c'est le poète Goethe qui le démontra. Il pris une pierre

de Bologne et l'excita avec de la lumière de différente couleur. Il s'aperçut que le bleu excitait sa phosphorescence rouge, et que la lumière rouge en était incapable. Donc que la pierre n'accumulait pas la lumière rouge de la lumière du soleil, mais que la lumière bleue causait le phénomène de la phosphorescence.

Toujours au seizième siècle, le docteur italien Nicolo Monardes remarquait des reflets étranges de certaines solutions utilisées en pharmacie. Et au début du dix-neuvième siècle, Sir John Herschel remarque le même phénomène avec une solution de sulfate de quinine. Une solution de sulfate de quinine est transparente mais peut paraître bleu ciel si examinée sous un certain angle. Herschel pensa que le phénomène était dû à la dispersion de la lumière.

C'est le mathématicien Stokes qui montra que le phénomène n'était pas du tout relié à la dispersion. Il fit cette démonstration en suivant les mêmes conditions expérimentales que celles de Goethe, trois siècles auparavant. De plus, il trouva que dans la partie invisible de la lumière (i.e. ultra-violet), le phénomène de luminescence était beaucoup plus important. Stokes proposa le mot *fluorescence* du nom d'un cristal naturel, le spath fluor, dont certaines variétés présentent des reflets bleus comme le sulfate de quinine.

Stokes examina plusieurs substances: extraits de plantes, verres, papier, etc. Il trouva que la fluorescence était rouge pour les extraits de chlorophylle. Il découvrit aussi que, dans la majorité des cas, les rayons produits par fluorescence sont toujours moins réfrangibles que ceux qui les produisent (règle de Stokes en 1852), faisant ainsi référence à l'angle de réfraction d'un faisceau lumineux en fonction de sa longueur d'onde.

Edmond Becquerel était persuadé que la fluorescence était en fait de la phosphorescence mais qui s'éteignait rapidement. Pour en faire la démonstration, il construisit le premier appareil, le 'phosphoroscope'. Il mesura ainsi la durée de vie de la luminescence de plusieurs substances. Il est aussi celui qui énonça le concept de 'piège à électrons'. Urbach trouva une relation mathématique pour calculer la 'profondeur' des pièges à électrons. Il pouvait ainsi faire la distinction entre la phosphorescence et la fluorescence, mais la différence entre les deux termes était très mince.

Après que le physicien R.W. Wood ait observé que certaines molécules pouvaient avoir une fluorescence persistant quelques fractions de millièmes de seconde, J. Perrin trouva une méthode expérimentale simple pour trancher entre l'emploi des termes fluorescence et phosphorescence. Sa méthode consistait à chauffer le corps luminescent et à observer la variation de

l'intensité de luminescence en fonction de la température. Si le phénomène était de la phosphorescence, alors l'intensité augmentait. Par contre, la fluorescence ne variait pas ou diminuait quelque peu en fonction de la température.

C'est en 1928 que P. Lenard énonça une théorie toujours admise aujourd'hui. Cette théorie suppose que sous l'action des ondes photoélectriques les particules négatives (i.e. les électrons) subissent une désintégration puis une réintégration cyclique qui provoquent leur luminescence. De plus, les travaux de J. et F. Perrin ont apporté des indices sur les hypothèses de la théorie de la fluorescence et de la phosphorescence. Et c'est finalement la théorie des niveaux énergétiques de Frank-Condon qui a permis d'unifier les deux phénomènes (40).

Concernant la fluorescence des plantes vertes, comme écrit précédemment, Stokes trouva, un peu avant 1852, que la chlorophylle fluoresçait. Aujourd'hui il est possible de mesurer la fluorescence de la chlorophylle ainsi que sa durée de vie.

Un autre type de mesure est effectué avec des chloroplastes isolés ou des feuilles entières. Cette mesure est nommée 'l'effet Kautsky' (1934). H. Kautsky avait mesuré quantitativement ledit effet. Il s'agit en fait d'une courbe cinétique de la désactivation de la chlorophylle a. Pourtant,

l'observation de la variation de la fluorescence, chez une feuille, avait été observée à l'oeil nu par N.J.C. Müller, en 1874 (41).

Depuis le début du siècle la fabrication de détecteurs et de sources lumineuses a favorisé le développement de la méthode fluorimétrique. De nombreux instruments de mesure furent mis au point. Aujourd'hui, la mesure de la fluorescence n'a pas vraiment changé, sauf que les mesures sont plus précises et rapides, et les instruments plus sensibles.

Pour ce qui est de la fluorimétrie appliquée à l'étude de la photosynthèse, Hartmut K. Lichtenthaler est celui qui ouvra la porte pour les mesures sur le terrain. Il est aussi celui qui proposa l'indice de vitalité par des mesures fluorimétriques relative à la cinétique de la chlorophylle sur des feuilles entières (31,32,42). Quelques années auparavant, soit en 1975, G. Papageorgiou avait démontré que la fluorescence de chloroplastes, mesurée à la température ambiante provenait en majeure partie du photosystème II. Et huit ans plus tard, D.J. Kyle, N.R. Baker et C.J. Arntzen montraient que le photosystème I contribuait aussi, en plus petite proportion, à l'émission de fluorescence (42). Par la suite l'utilisation de la technique fluorimétrique fut utilisée par tous ceux travaillant en photosynthèse. Ceci démontre l'importance de la méthode comme outil précieux pour la mesure de l'activité photosynthétique chez les plantes.

Pour ce qui est de l'instrumentation en fluorimétrie, c'est Ulrich Schreiber qui y travailla le plus (41). En plus de la fluorimétrie conventionnelle (i.e. source excitatrice continue), il réalisa le montage d'un système pulsé, le PAM (Pulsed-Modulation fluorometer), pouvant mesurer, en plus des renseignements en fluorimétrie conventionnelle, des coefficients de 'quenching' photochimique et non-photochimique (43).

Les mesures 'réelles' sur le terrain, ou par avion, ne sont pas nombreuses. Les déterminations des dommages causés à la végétation par avion ont surtout été faites avec les spectres de réflectance, mesures qui ne renseignent pas sur l'activité photosynthétique (42). L'avantage de la fluorimétrie est que le signal de fluorescence ne provient que des feuilles vertes. Pour les mesures par avion, il faut prendre les données dans un très court laps de temps (34,42). Et d'une telle expérience, on ne peut tirer que peu d'informations. C'est la raison des 'mesures sur le terrain'.

La seule façon de vraiment évaluer les dommages à la végétation, par spectroscopie de fluorescence, est de mesurer l'activité avec un instrument portatif sur le terrain. Bien qu'il existe quelques appareils portatifs pour mesurer la fluorescence, la littérature n'est pas abondante concernant l'évaluation

in situ des dommages à la végétation. Notons une étude conjointe sur le sujet par Lichtenthaler (42) et Rock et al. (44).

3. De la spectroscopie photoacoustique

La méthode photoacoustique est connue depuis une centaine d'années. Ce type de spectroscopie sert à mesurer l'émission non-radiative provenant d'un corps ayant absorbé une lumière intermittente.

La découverte en 1880 de l'effet photoacoustique par Alexander Graham Bell (45), fut le début d'une nouvelle méthode spectroscopique pour mesurer la chaleur émise par un chromophore. Bell avait construit un appareil, dit-il, servant à écouter le son produit par un corps exposé à une lumière intermittente. Il le nomma le 'photophone'. La source de lumière était le soleil, et le détecteur, son oreille.

Mais Bell n'était pas le seul à travailler avec le photophone. Moins d'un an plus tard, plusieurs scientifiques publiaient leurs résultats; M. Mercandier, J. Tyndall, W.C. Röntgen et W.H. Preece (46). L'interprétation du phénomène dans le cas des gaz était unanime. Cependant, dans le cas des liquides et des solides, deux écoles de pensée proposaient une interprétation différente: i) Bell et Lord Rayleigh avaient choisi l'expulsion de gaz, après

contraction du corps, par les pores des échantillons; ii) W.H. Preece et M. Mercandier, par contre, ne croyaient pas à cette théorie, mais plutôt à un échauffement périodique du gaz dans la chambre, se traduisant par une expansion et contraction du gaz. Cette théorie avait été suggérée par le professeur Hughes.

Les années passèrent et la spectroscopie photoacoustique se développa peu et sombra dans l'oubli pendant environ cinquante années. De 1938 à 1970, la technique fut surtout utilisée pour l'analyse des gaz en infra-rouge (i.e. monoxyde et bioxyde de carbone, et bioxyde d'azote). Le fait que les mesures sur les liquides et les solides aient été mises en oubli pendant cette période n'est pas explicable. En 1973, J.G. Parker fit un essai pour expliquer le phénomène sur les solides. Cependant, sa théorie ne s'appliquait qu'à un solide transparent. Et finalement, en 1975-76, A. Rosencwaig et A. Gersho énonçaient une théorie générale sur l'effet photoacoustique dans le cas des solides. Cette théorie est maintenant connue sous le nom de la 'théorie Rosencwaig et Gersho', ou encore la 'théorie RG' (37).

Plusieurs équipes ont apporté certains raffinements à la théorie RG, comme par exemple F.A. McDonald et G.C. Wetsel Jr. (47). D'autres ont expliqué plus précisément un cas spécifique, comme P. Poulet, J. Chambron et R. Unterreiner qui ont pris le cas spécifique des échantillons thermiquement épais (48).

Malgré tout, la théorie RG a toujours été la théorie la plus reconnue et acceptée.

Jusqu'à ce jour il n'y a aucune théorie qui a été publiée sur les échantillons hétérogènes. Pour ce qui est de l'effet photoacoustique chez les feuilles qui sont des échantillons hétérogènes, la spectroscopie photoacoustique est utilisée seulement comme outil de mesure des processus photochimiques. Après que l'équipe de Malkin ait montré la possibilité de mesurer l'activité photosynthétique sur des chloroplastes isolés (49), et sur des feuilles entières (6), il fut démontré qu'il était possible de quantifier non seulement la quantité de chaleur dégagée par un échantillon de feuille, mais aussi la quantité d'oxygène provenant des réactions photosynthétiques (50).

Depuis les années '80, un petit nombre d'équipes travaillent avec la technique photoacoustique pour une application en photosynthèse. Citons ici les plus importantes: S. Malkin (6), H. Lichtenthaler (51), R.M. Leblanc (52), C. Fork (53), et H. Vargas (54). Deux équipes travaillent avec la méthode de photoacoustique pulsée: D. Mauzerall (55) ainsi que K. Schaffner (56).

Toutes ces équipes effectuent leurs travaux en laboratoire. Aucune mesure réelle *in situ* n'a été faite par eux. Les seules mesures réelles sur le terrain ont été effectuées par M.H. De

Paula et ses collaborateurs (36). Mais dans leur cas, il était impossible de mesurer le dégagement d'oxygène car la détection se faisait avec un détecteur piézoélectrique.

D. Objectifs de recherche

Dans le cadre du travail de recherche pour la maîtrise en biophysique, l'objectif premier est de concevoir un appareil pour mesurer la photosynthèse sur le terrain, dans le cadre du dépérissement des forêts. Cet appareil se devait d'être portatif et entièrement contrôlé par ordinateur.

Deux techniques ont été combinées dans un seul appareil portatif. La technique de la spectroscopie photoacoustique ainsi que la technique d'induction de la fluorescence de la chlorophylle (i.e. effet Kautsky). Ces deux types de méthode sont des 'outils' très puissants en recherche photosynthétique car il est possible de mesurer les trois paramètres les plus importants de la photosynthèse, soient la fluorescence (énergie radiative), la chaleur (énergie thermique) et l'oxygène dégagé (énergie photochimique).

Il est donc possible de mesurer par fluorescence l'état de la chaîne de transport d'électron (i.e. indice de vitalité). Et par photoacoustique, il est possible de mesurer le rendement photochimique de cette chaîne de transport d'électrons par la mesure de la chaleur et de

l'oxygène dégagés. De plus, les deux techniques renseignent aussi sur la quantité relative de pigments chlorophylliens.

Suite à la conception et la mise au point de l'appareil de mesure, le second objectif est d'évaluer le fonctionnement de l'appareil et de ses composantes, autant en laboratoire que sur le terrain.

Et finalement, à long terme, le troisième objectif est la mesure *in situ* de la photosynthèse et la détection, avant dommage visuel, du dépérissement des forêts.

CHAPITRE II

THÉORIE

A. Fluorimétrie

Dans les feuilles les processus photosynthétiques sont associés avec des pigments. Ces pigments chlorophylliens ou caroténoïdiens absorbent l'énergie lumineuse et la transfèrent aux centres réactionnels, soit les photosystèmes II et I. À ces centres a lieu la séparation de charges ce qui permet le transport de l'électron jusqu'à la réduction du NADP^+ par l'entremise d'une chaîne protéinique de transport d'électrons.

Les chlorophylles a et b absorbent l'énergie lumineuse dans le bleu et le rouge du spectre électromagnétique (figure 5). La lumière bleue excite la chlorophylle au deuxième niveau singulet (S_2) et par la suite l'énergie est dissipée, en moins de 10^{-14} seconde, sous forme de chaleur, au premier niveau singulet (S_1). Par contre, la lumière rouge excite directement la chlorophylle au premier niveau singulet, et sa durée de vie est d'environ 10^{-9} seconde. Dans le cas des feuilles, la désexcitation de la chlorophylle excitée se fait du premier niveau singulet d'excitation au niveau fondamental par émission de chaleur ou de fluorescence. Chez les feuilles l'émission de fluorescence

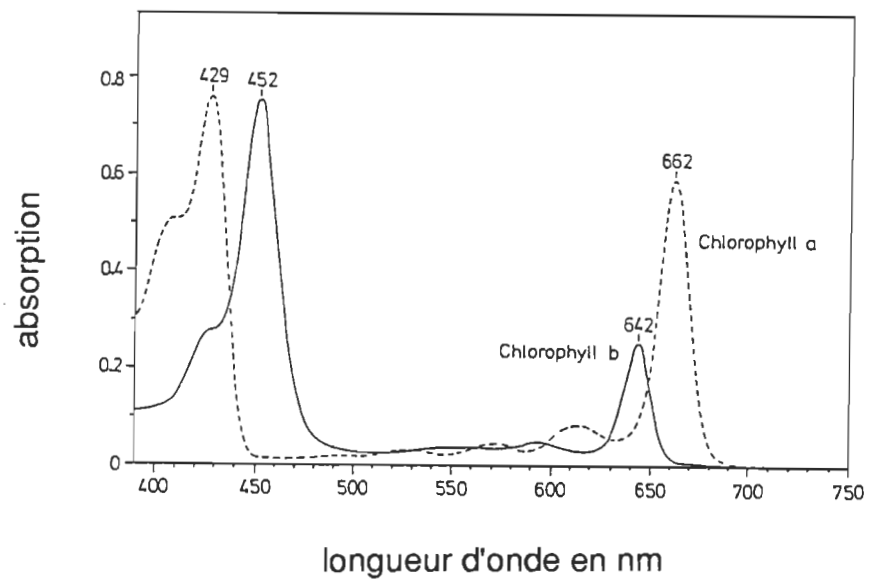


Figure 5: Spectre d'absorption de la chlorophylle a et b (42).

provient principalement de la chlorophylle a, car l'énergie absorbée par la chlorophylle b est totalement transférée, par migration d'excitons, à la chlorophylle a.

À la température ambiante, la fluorescence de la chlorophylle provient en particulier des chlorophylles associées au photosystème II. Celles associées au photosystème I ne contribuent que d'une faible fraction.

Sous des conditions optimales, pour une feuille, la plus grande partie de l'énergie photonique absorbée par les antennes contenant les chlorophylles est utilisée pour la photochimie (travail photochimique). La proportion d'énergie 'non-utilisée' est transformée en chaleur et en fluorescence. La quantité de fluorescence émise est environ de 2 à 5% de l'énergie absorbée. L'émission de fluorescence est dépendante du type de chloroplaste, de l'âge et de l'état physiologique de la feuille ainsi que de l'intensité et de la longueur d'onde de la lumière excitatrice.

Dans le cas où les processus sont altérés par un stress environnemental, la désexcitation de la chlorophylle a se fera surtout par émission de fluorescence ou de chaleur, c'est-à-dire une augmentation du niveau de fluorescence et/ou de chaleur émise. La relation entre les processus photosynthétiques et la fluorescence de la chlorophylle a est inversement proportionnelle. En se basant sur cette relation, il

est possible d'utiliser ce phénomène comme outil pour mesurer l'effet d'un stress sur la végétation.

Pour une feuille verte et saine, excitée à la bande de Soret (lumière bleue), le spectre de fluorescence montre deux bandes d'émission: l'une à environ 685 nm et l'autre à environ 740 nm. Le rapport des deux intensités de fluorescence, F_{685}/F_{740} , dépend de la concentration en chlorophylles dans la feuille (57). Comme les bandes d'absorption de la chlorophylle se chevauchent, il y a absorption de la lumière émise à 685 nm par la chlorophylle à 680 nm, et donc diminution de la quantité de fluorescence à 685 nm et possiblement augmentation de l'intensité de fluorescence à 740 nm. Si la concentration de chlorophylle est élevée alors l'absorption, par les autres pigments, de la lumière émise sera d'autant plus grande, ainsi le rapport F_{685}/F_{740} diminuera. Ce résultat peut aussi servir d'indice pour déterminer si la quantité relative de chlorophylle par unité de surface est affectée par un stress. De plus, lorsqu'on excite la chlorophylle par excitation des caroténoïdes avec une lumière bleue (470 nm), le rapport F_{685}/F_{740} n'est pas affecté par l'intensité de la lumière excitatrice. Cependant si l'excitation a lieu dans le rouge (680 nm), ce rapport diminuera. Un autre facteur influence le rapport F_{685}/F_{740} , soit celui de l'intégrité de la chaîne du transport d'électrons. Ce rapport augmente significativement si la chaîne photosynthétique entre le photosystème II et le photosystème I est brisée.

L'autre outil pour déterminer la vitalité des plantes est L'EFFET KAUTSKY, ou cinétique d'induction de la fluorescence de la chlorophylle. Lorsqu'une feuille verte, photosynthétiquement active, est incubée à la noirceur, les deux photosystèmes ne fonctionnent pas. L'appareil photosynthétique est alors dans l'état 1 (i.e. état de transition 1). Si l'échantillon est placé sous une lumière d'intensité constante, dans ce cas, l'intensité de fluorescence variera dans le temps (figure 6).

La courbe cinétique est grossièrement constituée de deux parties: a) une partie rapide, partant d'une intensité de fluorescence zéro à un maximum (f_{max}), dans un temps variant entre 100 ms et 1 s; b) une décroissance lente de la fluorescence (f_d) jusqu'à un état stationnaire de la fluorescence (f_s). Dans ce cas la photosynthèse est dans une état stationnaire. Pour une feuille saine, cet état stationnaire est obtenu après deux à cinq minutes, l'appareil photosynthétique est alors dans l'état 2 (i.e. état de transition 2), et la production d'oxygène est à son maximum. Ce type de phénomène n'est observé qu'avec des tissus photosynthétiquement actifs tels que feuille, algue ou chloroplastes isolés.

À l'échelle moléculaire, la cinétique d'induction de la fluorescence de la chlorophylle s'explique de la façon suivante.

La montée de zéro à f_{max} est reliée aux changements redox des accepteurs d'électrons primaires et secondaires du photosystème II

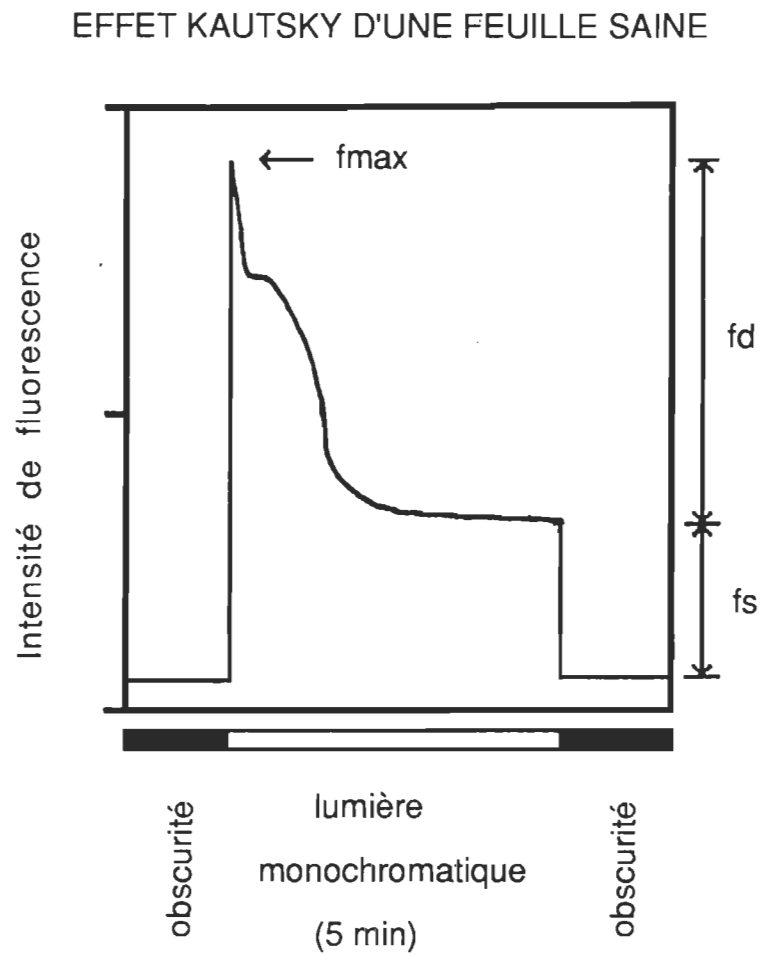


Figure 6: Cinétique d'induction de la fluorescence: effet Kautsky.

(Qa et Qb, et le 'pool' de plastoquinone, PQ). À la noirceur les accepteurs primaires Qa et Qb sont totalement oxydés. Alors les centres réactionnels du photosystème II sont 'ouverts'. Sous illumination, Qa (accepteur monoélectronique) est réduit et transfère alors l'électron à Qb (accepteur biélectronique). Par la suite, le 'pool' de plastoquinone, PQ (accepteur biélectronique), est réduit progressivement par Qb⁼. Au point (f_{max}) où la fluorescence est à son maximum, Qa, Qb et PQ sont totalement réduits (i.e. Qa⁻, Qb⁼, PQ⁼). Les centres réactionnels du photosystème II sont alors 'fermés'. Avec la mise en fonction du photosystème I qui oxyde PQ (de même que Qa et Qb), l'intensité de fluorescence décroît lentement du maximum (f_{max}) vers un état stationnaire de la fluorescence (f_s). Cette décroissance de la fluorescence est principalement due à l'instauration d'un gradient de pH de part et d'autre de la membrane thylacoïdienne, à la constante réduction et oxydation de Qa induite par la redistribution d'énergie dans le photosystème I, à la mise en fonction du courant dans la chaîne d'électrons et à la production d'oxygène. La distribution d'énergie au photosystème I, perdue après incubation à la noirceur, se fait avec la phosphorylation du complexe antenne de chlorophylles mobiles, après que le 'pool' de plastoquinone (PQ) ait été réduit. Donc à l'état stationnaire, f_s, la machine photosynthétique est dans l'état de transition 2.

L'utilisation du phénomène cinétique dans l'étude du dépérissement des forêts se fait avec le calcul de l'indice de vitalité, Rfd. La détermination de l'indice de vitalité s'effectue en évaluant la partie

décroissante de la fluorescence, f_d , par rapport à la fluorescence stationnaire, f_s , soit

$$R_{fd} = f_d / f_s \quad \text{où} \quad f_d = f_{\max} - f_s \quad (1)$$

L'indice de vitalité représente vraiment le potentiel photosynthétique de la feuille, donc de la plante. Et l'évaluation de la partie décroissante de la fluorescence est la mesure du degré de conversion de quanta photosynthétique.

L'indice R_{fd} est mesuré à deux longueurs d'onde, soit 685 nm et 740 nm. Ce choix donne plus d'information sur l'état physiologique de la photosynthèse. L'indice de vitalité couvre tout le processus photosynthétique incluant la période d'induction, la transition de l'état 1 à l'état 2, et la fixation du bioxyde de carbone. Donc, l'indice R_{fd} permet la détection des changements dans les fonctions photosynthétiques (32). Normalement, le rapport de fluorescence, F_{685}/F_{740} , se fait à partir du spectre de fluorescence. Dans ce cas, l'intensité de fluorescence des deux bandes est mesurée à l'état stationnaire de la fluorescence (f_s), c'est-à-dire lorsque l'intensité de fluorescence est constante dans le temps. Il est aussi possible de mesurer le rapport F_{685}/F_{740} à partir des courbes de cinétique servant à trouver l'indice de vitalité (R_{fd}). Alors, le rapport F_{685}/F_{740} sera le rapport entre la fluorescence stationnaire (f_s) à 685 nm et la fluorescence stationnaire à 740 nm.

Donc par la mesure de la cinétique d'induction de la fluorescence de la chlorophylle, soit l'effet Kautsky, il est possible de calculer: a) l'indice de vitalité (R_{fd}), et b) le rapport F_{685}/F_{740} pris à l'état stationnaire.

B. Photoacoustique

Un échantillon gazeux, liquide ou solide, est placé dans une enceinte hermétique. Une fenêtre incorporée à la cellule permet l'introduction du faisceau d'une source lumineuse monochromatique intermittente. Bien entendu, cette fenêtre est construite d'un matériel n'absorbant pas la lumière excitatrice.

Lorsque l'échantillon absorbe la lumière incidente excitatrice, les molécules du matériel sont excitées à un état singulet supérieur à S_0 . Parmi les processus de désexcitation, celui de la conversion interne (ou transition non-radiative) est relativement importante en terme de rendement quantique. Cette conversion interne est synonyme d'émission de chaleur. Comme le faisceau incident est intermittent, la chaleur dégagée sera aussi intermittente. Suite à l'excitation de la molécule par un photon, l'émission de chaleur prend entre 10^{-9} s à 10^{-12} s, en terme de fréquence ceci équivaut à 10^9 Hz et 10^{12} Hz. La fréquence de modulation du faisceau d'analyse étant beaucoup plus basse, c'est-à-dire entre 10 Hz et 1000 Hz, alors l'émission de

chaleur se fera immédiatement après absorption de la lumière provenant de la source d'excitation.

Chez les feuilles, le passage de l'état singulet à l'état triplet est négligeable. Si l'excitation a lieu lors de l'absorption d'une lumière ayant une longueur d'onde d'environ 680 nm, alors les chlorophylles seront majoritairement excitées à l'état singulet S_1 . Et donc, l'émission de chaleur proviendra surtout des conversions internes de S_1 à S_0 . La chaleur émise par les chlorophylles et les autres molécules excitées, diffusera dans l'échantillon et sera transmise à l'air environnant par convection.

Suite à l'émission de chaleur par l'échantillon, le gaz environnant s'échauffera produisant ainsi une augmentation de pression dans la cellule hermétique. Selon la loi générale des gaz, pour un système clos (i.e. volume constant), une variation de température provoque un changement de pression.

La loi générale est la suivante;

$$PV/T = P'V'/T' \quad (2)$$

Dans cette équation P , V et T sont respectivement, la pression, le volume et la température du gaz à l'état initial tandis que P' , V' et T' , la pression, le volume et la température du gaz à l'état final.

Pour un système clos, de volume fixe, l'équation (2) devient;

$$P/T = P'/T' \quad (3)$$

Dans le cas d'une variation de température, la pression finale sera la suivante:

$$P' = PT'/T \quad (4)$$

En considérant notre système, on note que la variation de température intermittente variera entre T et T' . Donc, la pression du gaz dans la cellule variera entre P et P' . Si un microphone est fixé à l'enceinte de la cellule, il sera possible de mesurer cette variation de pression (les microphones étant un instrument sensible aux variations de pression), et de la quantifier.

Cependant, cette explication pour la génération de l'onde acoustique est simpliste. Et pour être rigoureux, on explique le phénomène photoacoustique par la théorie de Rosencwaig et Gersho (théorie RG) (37). La théorie RG est basée sur une analyse en une dimension de la production du signal photoacoustique dans une cellule hermétique, donc à volume de gaz constant.

La figure 7 représente la cellule photoacoustique. Elle possède un diamètre D et une longueur L . Quant à l'échantillon, son diamètre

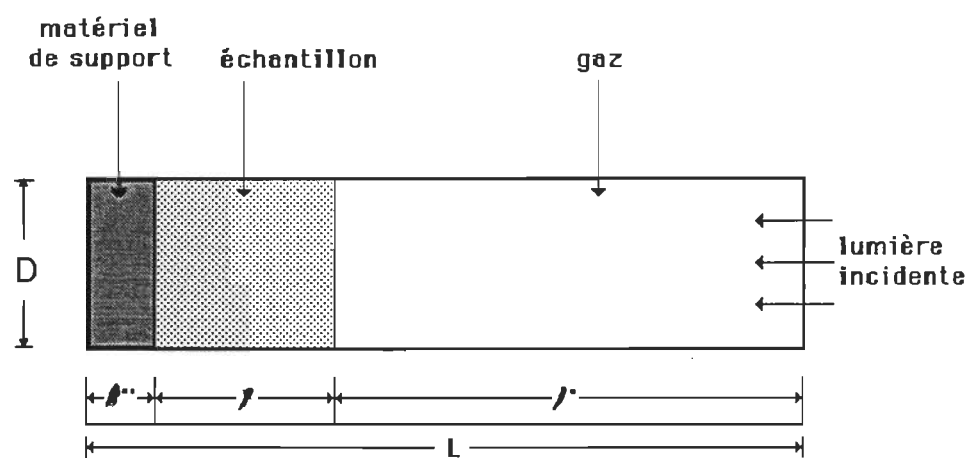


Figure 7: Schéma d'une cellule photoacoustique.

est D et l'épaisseur, l . L'échantillon est déposé sur un matériel de support d'épaisseur l'' . La longueur du gaz dans la cellule est l' . Pour ce qui suit, aucune apostrophe signifie;"de l'échantillon", simple apostrophe;"du gaz" et, double apostrophe;"du matériel de support".

La théorie stipule que le gaz et le matériel de support n'absorbent pas la lumière incidente intermittente. De plus, elle stipule aussi que la longueur de la cellule, L , est beaucoup plus petite que la longueur d'onde du signal photoacoustique, et que le microphone détecte la pression moyenne à l'intérieur de la cellule.

Quant à la modulation de la lumière monochromatique incidente, la théorie RG est basée sur une lumière dont l'onde est sinusoïdale.

$$I = 0,5 I_0(1 + \cos \omega t) \quad (5)$$

où I est l'intensité lumineuse; I_0 , l'intensité du faisceau incident (W/m^2); ω , la fréquence qui est égale à $2\pi f$ (f = fréquence en Hertz); t , le temps d'échantillonnage.

L'échantillon est la source de chaleur. Si la température de l'échantillon varie selon la quantité de photons provenant de la source excitatrice, alors la variation de l'intensité, I , induira donc une variation de la température de l'échantillon. Ainsi l'échantillon devient source de chaleur. Cette variation de température est fonction de la position (x), c'est-à-dire la distance par rapport à la

surface de l'échantillon, et du temps. La distribution de température dans la cellule est dépendante des paramètres optique, thermique, et géométrique du système que comprend l'échantillon et la cellule.

La température à la surface de l'échantillon ($x = 0$) est donnée par l'expression suivante:

$$T(x,t) = \beta_0 + F_0 + \theta_1 \cos \omega t - \theta_2 \sin \omega t \quad (6)$$

où β_0 est la température ambiante près de la paroi de la cellule (degré Celcius); F_0 , l'incrément de la température due à la composante de l'état stationnaire de la chaleur absorbée, c'est-à-dire la différence de température entre la paroi de la cellule et l'échantillon en degré Celcius; θ_1 et θ_2 , la partie réelle et imaginaire, en phase et en quadrature respectivement, de l'amplitude de la température périodique à l'interface solide-gaz (à $x = 0$).

θ est l'élévation de température due à la dissipation de l'énergie électromagnétique provenant de transitions non-radiatives. De plus selon Rosencwaig et Gersho (37), le terme F_0 , à la température ambiante, est égal à zéro.

En fonction du temps et de la distance, l'équation (6) devient;

$$T_{a.c.}(x,t) = [\theta_1 \cos(\omega t - a'x) - \theta_2 \sin(\omega t - a'x)]e^{-a'x} \quad (7)$$

où $T_{a.c.}$ est la variation de la température périodique ($^{\circ}\text{C}$); a' , le coefficient de diffusion thermique du gaz (cm^{-1}).

Le terme $e^{-a'x}$ représente la diffusion de la chaleur dans le gaz. Et comme on peut le constater, le transport de la chaleur dans le gaz sera atténué en fonction de la distance et atteindra rapidement zéro. Le terme a' est le coefficient de diffusion thermique du gaz. Il s'exprime par l'équation suivante:

$$a' = (\omega/2\alpha)^{1/2} \quad (8)$$

α est défini par l'expression,

$$\alpha = k/\rho C. \quad (9)$$

où α est la diffusivité thermique (cm^2/s); k , la conductivité thermique ($\text{cal}/\text{cm}\cdot\text{s}\cdot^{\circ}\text{C}$); ρ , la densité (g/cm^3); C , la chaleur spécifique ($\text{cal}/\text{g}\cdot^{\circ}\text{C}$).

Les unités du coefficient de diffusion thermique étant en cm^{-1} , ils sont transposés en unités de grandeur en prenant la réciproque. Cette opération donne la longueur de diffusion thermique, μ' . Et on peut voir clairement, sur la figure 8, qu'à une distance $x = 2\pi\mu'$, la variation de température périodique, $T_{a.c.}$, est totalement atténuée. Donc l'épaisseur $2\pi\mu'$ de gaz répond thermiquement à la modulation de température à la surface de l'échantillon. Suite à un cycle de

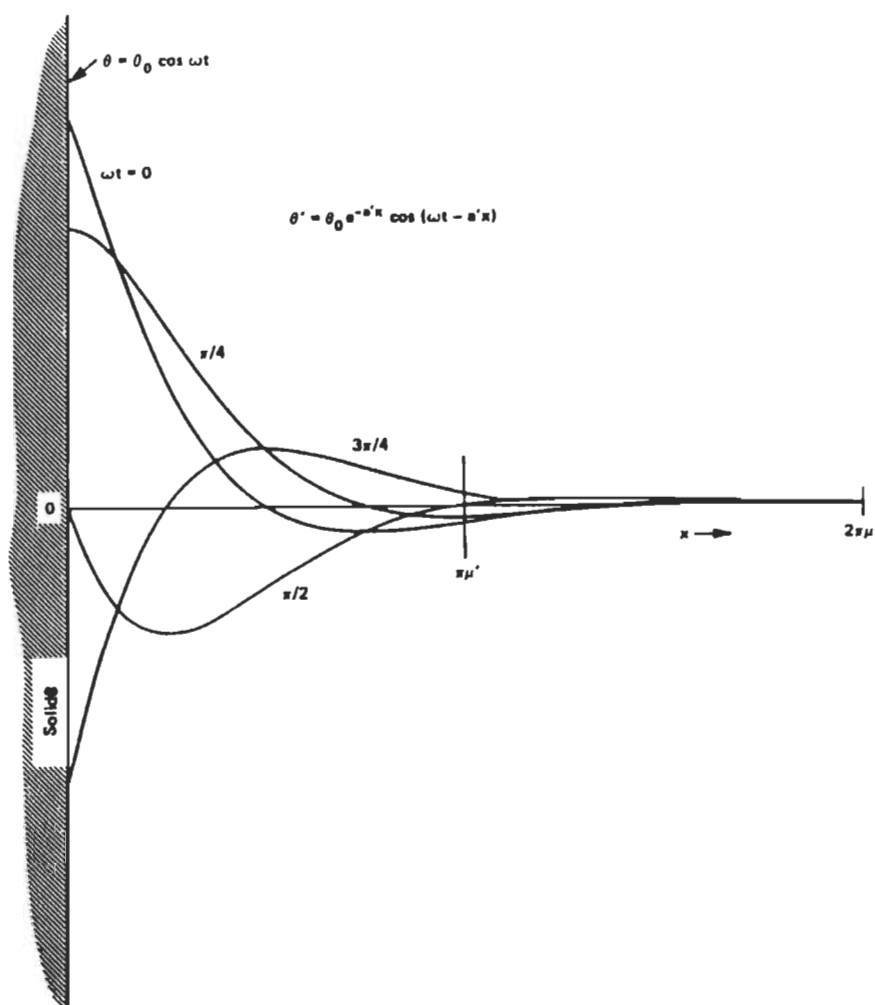


Figure 8: Variation spatiale de la température périodique à l'interface gaz-échantillon (37).

modulation, la surface de l'échantillon revient à la température ambiante, donc $T_0 = \beta_0$, car

$$T_0 = \beta_0 + F_0 \quad (10)$$

A cause du chauffage périodique de la mince couche de gaz au-dessus de l'échantillon, cette couche de gaz prendra de l'expansion et se contractera périodiquement. Ainsi, cette couche gazeuse jouera le rôle d'un piston, produisant une variation de pression dans toute la cellule, c'est-à-dire une onde acoustique. On peut s'imaginer cette variation de pression comme si l'une des parois de la cellule se déplaçait d'une quantité égale à $2\pi\mu'$ vers l'intérieur, produisant ainsi une élévation de pression dans toute la cellule. On note que l'épaisseur du piston, $2\pi\mu'$, est en fait proportionnelle à μ' , et donc que la variation périodique de la pression est fonction de la fréquence. La longueur de diffusion thermique, μ' , est inversement proportionnelle à ω .

Cependant, pour décrire l'enveloppe de la variation de pression ou la pression moyenne dans la cellule photoacoustique, la loi des gaz n'est pas appropriée car le signal photoacoustique dépendra des caractéristiques physiques de l'échantillon, du gaz contenu dans l'enceinte hermétique, de la cellule photoacoustique, et du faisceau modulé. L'équation (11) représente l'enveloppe complexe de la variation sinusoïdale du changement de pression dans le gaz, c'est-à-dire la pression réelle dans la cellule.

$$Q = \frac{\varepsilon \log \gamma P_o}{2\sqrt{2} T_o k' a' (\beta^2 - \sigma^2)} \times \left[\frac{(r-1)(b+1)e^{\sigma^1} - (r+1)(b-1)e^{-\sigma^1} + 2(b-r)e^{-\beta^1}}{(g+1)(b+1)e^{\sigma^1} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma^1}} \right] \quad (11)$$

où $b = k''a'' / ka$, $g = k'a' / ka$, $r = (1-i)\beta / 2a$

et $\sigma = (1-i)a$ (i représente la partie imaginaire)

où ε est le coefficient d'absorption optique (cm^{-1}); γ , le rapport des capacités calorifiques; P_o , la pression atmosphérique (atm).

Q n'est pas la variation de pression dans la cellule, mais la pression moyenne due au piston acoustique, soit à $2\pi\mu'$. Les unités de Q sont des unités de pression, et elles sont exprimées en atmosphère.

Heureusement, Rosencwaig et Gersho ont déterminé des cas spéciaux. Dans le cadre de cette étude, prenons seulement les deux cas intéressants suivants: i) le cas du noir de carbone car c'est notre standard et ii) le cas de la feuille.

Le noir de carbone est considéré comme un corps thermiquement mince. L'équation décrivant l'enveloppe du signal est la suivante:

$$Q \approx \frac{(1-i)}{2a'} \frac{\mu''}{k''} \frac{\gamma P_o \log}{2\sqrt{2} T_o r'} \quad (12)$$

Dans ce cas, il y a opacité photoacoustique, mais aussi opacité optique (i.e. le signal est indépendant du coefficient d'absorption

optique, ϵ). Le signal variera selon ω^{-1} . Pour démontrer cette affirmation, regroupons les constantes de l'équation (12), dans la constante, A.

$$Q \approx \frac{A \mu''}{a'} \quad (13)$$

μ'' et a' étant dépendant de ω , nous avons,

$$Q \approx \frac{A}{\omega} \quad (14)$$

Dans le cas de la feuille, nous prenons l'exemple d'un échantillon thermiquement épais. Ce type d'échantillon est optiquement opaque, mais ne l'est pas photoacoustiquement car seulement la lumière absorbée dans une couche correspondant à une profondeur équivalente à μ qui contribuera au signal photoacoustique. L'enveloppe du signal est exprimée ainsi,

$$Q \approx \frac{-i \epsilon \mu}{2a'} \left(\frac{\mu}{k} \right) \frac{\gamma P_0 l_0}{2\sqrt{2} T_0 \tau'} \quad (15)$$

On note que le signal sera dépendant de la longueur d'onde de la lumière incidente. Et par la même démonstration que précédemment, on constate que le signal photoacoustique variera selon $\omega^{-3/2}$. Bien que le cas de la feuille soit un cas bien particulier puisque nous sommes en présence d'un échantillon hétérogène et que la théorie n'est basée que sur des échantillons homogènes, l'équation (15) est

unique pour représenter le phénomène physique de la génération du signal photoacoustique. Cette formule explique bien la génération du signal, mais ce qui pourrait affecter le résultat théorique, est la propagation de la chaleur dans l'échantillon hétérogène. Cependant, il faut se rappeler que Q est l'enveloppe du signal photoacoustique, donc une moyenne. La feuille apparaîtra donc comme un échantillon homogène, pour ce qui est du phénomène physique de la photoacoustique.

La démonstration succincte de la théorie RG permet donc d'expliquer le phénomène photoacoustique. D'autres équipes ont démontré que dans certains cas, par exemple le cas des solides thermiquement épais, nous pourrions avoir un second piston acoustique causé par les vibrations de l'échantillon (47). Cette hypothèse fut confirmée par Poulet et Chambron (48). Cependant, le second piston n'existe pas pour les solides thermiquement minces, comme le noir de carbone. Quant à la feuille, elle est considérée comme un échantillon thermiquement épais, par conséquent le second piston pourrait contribuer au signal photoacoustique. Toutefois le phénomène n'a jamais été observé pour les échantillons photosynthétiques.

CHAPITRE III

CONCEPTION ET MISE AU POINT DU PHOTOMETRE PORTATIF DE PHOTOACOUSTIQUE ET DE FLUORESCENCE

A. Partie photoacoustique

Le nouveau photomètre acoustique (voir figure 9) utilise comme source de lumière modulée d'analyse une diode électro-luminescente (D.E.L.) (Hewlett Packard HLMP-4101, Mississauga, ON) émettant un faisceau lumineux de 650 nm possédant une bande passante de 25 nm. La modulation du courant électrique alimentant la D.E.L. est assurée grâce à un circuit électronique réalisé dans nos laboratoires (voir annexe I). Ce circuit permet de moduler l'intensité de la diode électroluminescente avec une amplitude variable. L'intensité lumineuse émise est directement proportionnelle au courant appliqué à la D.E.L. dans la zone de linéarité de celle-ci. Peu importe l'amplitude choisie, il ne faut pas que la fonction de courant passe par zéro, la D.E.L. étant un dispositif semiconducteur, elle nécessite une tension plus positive sur l'anode que sur la cathode. Dans le cas où la cathode serait plus positive que l'anode, il n'y aurait aucune émission de photons. Ce modulateur est constitué de deux étages; i) correcteur de tension et ii) convertisseur tension/courant. Le correcteur de tension sert à maintenir une tension positive à l'entrée du second

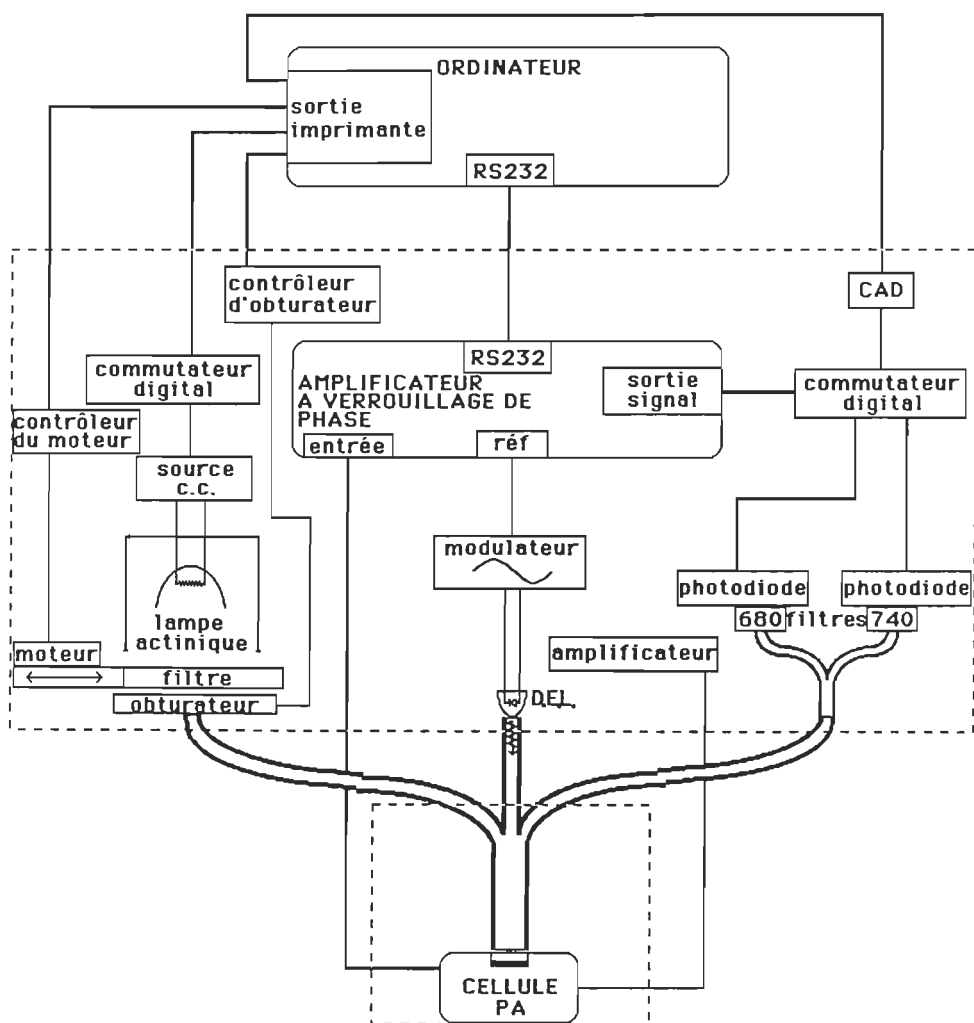


Figure 9: Diagramme schématique du photomètre portatif de photoacoustique et de fluorescence.

étage, peu importe l'onde appliquée. Il effectue cette correction en appliquant au convertisseur tension/courant l'onde soustraite de son sommet négatif, conservant ainsi une polarité positive à l'entrée du second étage.

Le second étage effectue la conversion de la tension à son entrée en un courant selon la relation suivante

$$I = V/100 \quad (16)$$

où I est le courant (ampère) et V , la tension (volt).

La sortie de l'oscillateur de l'amplificateur à verrouillage de phase (EG&G, modèle 5210, Toronto, ON) est connectée à l'entrée du modulateur de la D.E.L. (E_{in}). L'onde provenant de l'oscillateur de l'amplificateur à verrouillage de phase est centrée à zéro volt (bipolaire), à une amplitude variable (0 à 2000 mV rms), et elle est sinusoïdale. Pour contrôler l'amplitude et la fréquence de modulation, un ordinateur portable (Tandy 1400 LT, Radio Shack Division, InterTan Canada Ltd, Barrie, ON) est utilisé avec l'amplificateur à verrouillage de phase. L'ordinateur contrôle l'amplificateur à verrouillage de phase et ce dernier alimente le circuit électronique (+15 V et -15 V).

La lumière rouge modulée alors obtenue d'une intensité variant entre 0 et 4,7 W/m² est dirigée vers l'échantillon contenu dans une cavité hermétique (la cellule photoacoustique MTEC, modèle 100,

Ames, IA), par l'une des branches d'un guide optique trifurqué fabriqué en verre (Oriel 77536, Stratford, CT). La deuxième branche de ce guide optique sert à transmettre un faisceau de lumière blanche non modulée de forte intensité (Oriel 100 W, QTH No. 6359, Stratford, CT) en l'adjoignant à un guide optique d'extension (Oriel 77524, Stratford, CT). Cette lumière actinique d'une intensité variant entre 0 et 845 W/m² selon neuf échelons sert à saturer les processus photochimiques de la photosynthèse lorsqu'une feuille de plante ou chloroplastes isolés sont analysés. Cette lampe est alimentée par une source de tension continue de 12 volts (Kepco, modèle RAX 12-14K, Flushing, NY). La troisième branche du guide optique transmet l'émission de fluorescence au détecteur (voir partie photomètre de fluorescence).

L'application de la lumière blanche saturante non modulée s'effectue lorsque l'obturateur électronique (Melles Griot 04 IES 001, Irvine, CA) se trouve dans la position "ouvert". L'ouverture et la fermeture de l'obturateur sont assurées par l'ordinateur portatif via son port parallèle par l'entremise du contrôleur. Ce contrôleur a été entièrement développé dans nos laboratoires. L'obturateur électronique nécessite, pour son ouverture, une impulsion de 165 volts continu pendant environ 10 millisecondes, suivi du maintien de 28 volts continu. Ceci est réalisé par le circuit électronique du contrôleur (voir annexe II). Les avantages de ce circuit sont que sa fabrication n'est pas coûteuse et qu'il n'y a pas de dissipation de chaleur provenant de l'électronique, donc pas de perte d'énergie.

Les signaux électriques générés au niveau de la cellule photoacoustique sont transmis à l'amplificateur à verrouillage de phase. L'ordinateur contrôle l'amplificateur et effectue l'acquisition des données photoacoustiques par son port RS232. Il existe une autre option, soit celle de lire les signaux électriques sur un convertisseur analogique/digital, ou CAD (DDC ILC Data Device Corporation, ADC-00403, Bohemia, NY) via le port parallèle de l'ordinateur. Ce convertisseur analogique/digital est alimenté par deux sources de tension continue: l'une de 15 volts (Hammond HPCD 015 001, Guelph, ON) et l'autre de 5 volts (Hammond GFOF M-5, Guelph, ON).

B. Partie de la fluorescence

Pour les mesures de fluorescence, l'échantillon demeure dans la cellule photoacoustique. La fluorescence de la chlorophylle est mesurée suite à l'excitation du pigment à l'aide de la lumière blanche saturante employée en photoacoustique. Pour éviter la saturation des détecteurs par cette lumière blanche, un filtre coupe-haut (505 nm) (Balzers DT-Blue, Malborough, MA) est placé entre la source de lumière blanche et l'obturateur électronique. Ce filtre dichroïque ne s'échauffe pas car il absorbe peu de lumière, réfléchissant ainsi la lumière non transmise. L'entraînement du filtre est réalisé par un moteur (Efstonscience, 25 rpm, Toronto, ON) à courant continu (i.e 5 volts) contrôlé via le port parallèle de l'ordinateur.

L'émission de fluorescence est collectée par la troisième branche du guide optique trifurqué. Cette branche est connectée à une autre fibre optique mais cette fois bifurquée (Oriol 77533, Stratford, CT) pour permettre la détection simultanée de la fluorescence par deux photodiodes (EG&G Instruments Div. HUV-4000B, Toronto, ON). Deux filtres interférentiels de 680 nm et de 740 nm (Ditric Optics Inc., 1 po. diam., Hudson, MA) permettent de séparer l'émission de fluorescence des deux photosystèmes juste avant d'être détectée par les photodiodes. Les préamplificateurs des photodiodes sont alimentés par une source de tension continue de 15 volts (Hammond HPCD 015 001, Guelph, ON). Les sorties des préamplificateurs sont reliées à un multiplexeur, ou commutateur digital, lequel permet la sélection du signal appliqué au convertisseur analogique/digital, sous le contrôle de l'ordinateur portable via son port parallèle. D'autres plans de l'électronique apparaissent en annexes (voir annexes III à VI).

C. Pour les mesures sur le terrain

Pour le transport de l'appareil, les composantes suivantes sont installées dans un boîtier fabriqué en aluminium: blocs d'alimentation, lampe actinique, filtre amovible, obturateur électronique, diode électroluminescente, photodiodes avec leurs filtres respectifs, guide optique simple (de rallonge) et bifurqué, convertisseur analogique/digital, multiplexeur, contrôleur de l'obturateur

électronique, contrôleur du filtre amovible et un ventilateur pour évacuer la chaleur émise par la lampe de 100 watts. À cette boîte est vissé l'amplificateur à verrouillage de phase tandis que le circuit du modulateur de la diode électroluminescente est installé à l'intérieur même de l'amplificateur. Cette unité principale est logée dans un coffret de transport (Instruments Protech, Trois-Rivières, Qc).

La cellule photoacoustique possède sa propre valise de transport mais, lors des mesures photoacoustiques et de fluorescence, la cellule est transférée dans une boîte en aluminium étanche à la lumière. Cette boîte sert aussi de boîtier de transport pour le guide optique trifurqué. Le guide optique est fixé à l'intérieur de cette boîte de façon à être toujours à la même position.

Le système peut être alimenté directement du secteur de 110 volts ou par une génératrice (Kubota 1000 W, modèle NA1000, Markham, ON) pour des expériences sur le terrain.

Dans les *tableaux 3 et 4* sont résumées les caractéristiques les plus importantes du DOOZER ou du photomètre portatif de photoacoustique et de fluorescence.

Tableau 3

Caractéristiques du photomètre: première partie.

COMPOSANTES INTERNES

SOURCES D'EXCITATION:

- Diode électro-luminescente
 - $\lambda = 650 \pm 25 \text{ nm}$
 - I_{mod} de 0 W/m^2 à $4,7 \text{ W/m}^2$
(contrôle du courant)
 - modulation sinusoïdale
 - 10 Hz et 10 000 Hz
- Lampe actinique
 - I_{lact} de 0 W/m^2 à 845 W/m^2
 - 8 Intensités
 - Alimentation C.C.
(ondulation + bruit < 0,5%)

FILTRES:

- Lampe actinique
 - Dichroïque coupe-haut 505 nm
- Photodiodes
 - Bande passante $680 \pm 20 \text{ nm}$
 - Bande passante $740 \pm 20 \text{ nm}$

DÉTECTEURS:

- Photodiodes
 - Constante de temps = 9,4 ms
- Cellule PA
 - Microphone
 - 5 Hz à 10 000 Hz

Tableau 4

Caractéristiques du photomètre: deuxième partie.

CONTRÔLE ET TRAITEMENT DES DONNÉES:

- Ordinateur
 - Compact et portatif
 - Contrôle complet
 - Acquisition des données
 - Environnement facile à utiliser
 - Traitement complet de données

OPTIONS DE MESURE:

- Photoacoustique modulée
- Photoacoustique pulsée (à venir)
- Induction cinétique de fluorescence
- Induction cinétique de chaleur (à venir)

ACQUISITIONS:

- Amplificateur
 - à verrouillage de phase -5 données/s
- Convertisseur analogue/digitale -2000 données/s

D. Traitement des données

À la fin d'une expérience, les données sont enregistrées sous forme de couple ou triplet de données ayant deux ou plusieurs vecteurs. Dans le cas de l'expérience de fluorescence, le premier vecteur a une coordonnée en temps, et l'autre en nombre de niveau du convertisseur analogue/digital, qui est directement proportionnel à l'intensité de fluorescence. Si une seule longueur d'onde d'émission est sélectionnée, alors un couple sera enregistré. Mais si les deux longueurs d'onde sont choisies, un triplet de vecteurs sera enregistré sur disquette.

Dans le cas des mesures photoacoustiques, des triplets sont enregistrés. Le nombre de triplet dépend du type d'expérience choisie. Dans le cas d'une expérience simple (i.e. expérience avec seulement le faisceau modulé ou une expérience avec le faisceau actinique allumé en permanence), le triplet de vecteurs enregistré est constitué de la fréquence de modulation du faisceau d'analyse, du niveau du signal photoacoustique provenant de l'amplificateur à verrouillage de phase (en volt) ainsi que de l'angle de phase du signal photoacoustique.

Dans le cas d'une expérience photoacoustique par laquelle le faisceau actinique est alternativement allumé et éteint, deux triplets sont enregistrés. Ces triplets sont constitués des éléments suivants: fréquence de modulation, niveau du signal photoacoustique et angle de phase du signal. Le premier triplet est enregistré en présence du

faisceau d'analyse seulement (le faisceau actinique étant éteint), et le second avec l'ajout du faisceau actinique.

1. En fluorimétrie

À partir de la courbe de la cinétique de la fluorescence de la chlorophylle, il est possible de calculer l'indice de vitalité (Rfd) (équation 1) proposé par H. K. Lichtenthaler (42).

Ce calcul se fait à partir de la courbe apparaissant sur l'écran de l'ordinateur portatif (voir figure 6), pour l'une et/ou l'autre des deux longueurs d'onde d'émission (i.e. 680 nm et 740 nm). Il est important de noter le fait que la mesure de la fluorescence se fait à 680 nm et 740 nm, les termes F680, F740 et, F680/F740 seront utilisés. L'émission de fluorescence de la chlorophylle a un maximum à 685 nm et 740 nm. Le minimum de la courbe (cinq points enregistrés à l'obscurité) est mis à zéro par l'addition d'une constante. Le maximum de fluorescence (fmax) est noté à l'aide d'un pointeur dont l'opérateur déplace à volonté la position le long de la courbe. L'autre valeur demandée dans le calcul de l'indice de vitalité est le niveau de fluorescence à l'état stationnaire (fs). Ce vecteur est trouvé de la même façon que le maximum de fluorescence, mais à la fin de la courbe. L'indice de vitalité est calculé par l'opérateur à partir des deux niveaux de fluorescence.

Dans le cas où la fluorescence est enregistrée pour les deux longueurs d'onde d'émission, le rapport F_{680}/F_{740} sera calculé par l'opérateur à partir de la valeur de la fluorescence stationnaire (f_s) prise à 680 nm et celle prise à 740 nm.

2. En photoacoustique

Le traitement de données est basé sur la méthode de l'analyse quantitative de l'amplitude et de la phase introduit par P. Poulet, D. Cahen et S. Malkin (50), plus précisément, ils sont dérivés de ceux utilisés par N'soukpoé-Kossi et coll. (52).

Voici les équations utilisées dans le traitement des données photoacoustiques.

À hautes fréquences (> 200 Hz), il est possible de calculer le stockage d'énergie photosynthétique (S.E.P.). Ceci est rendu possible avec l'application d'une lumière blanche saturante et non-modulée. Avant l'application du faisceau actinique, une grande partie de l'énergie provenant de la lumière d'analyse est absorbée par les pigments chlorophylliens et transférée à la chaîne de transport d'électrons. Cette quantité d'énergie est 'perdue' en tant que signal photoacoustique, car elle est stockée dans les réactions photochimiques. Le signal photoacoustique est alors à un certain niveau ($Q_{(m)}$). Sous l'application de cette lumière actinique, les processus photochimiques sont saturés,

et par conséquent la partie de l'énergie 'modulée' passant dans la chaîne du transport d'électrons est complètement restituée sous forme de chaleur directement par les chlorophylles. Donc le signal photoacoustique augmente pour atteindre un autre niveau ($Q_{(m+a)}$). Par la relation suivante, le stockage d'énergie photosynthétique est calculé (voir la schématisation du phénomène sur la figure 10).

$$S.E.P. = (Q_{(m+a)} - Q_{(m)}) / Q_{(m+a)} \quad (17)$$

où $Q_{(m+a)}$ est le signal photoacoustique total en présence du faisceau modulé et actinique (volt), et $Q_{(m)}$ le signal photoacoustique total en présence uniquement de la lumière modulée (volt).

À basse fréquence de modulation (< 200 Hz), on peut calculer la quantité d'oxygène produite par l'échantillon de feuille verte. Ceci est réalisable car aux basses fréquences de modulation l'oxygène photosynthétique est détectable photoacoustiquement. La pression dans la cellule due à la production d'oxygène augmentera lorsque le faisceau actinique sera éteint. On sait que l'application d'une lumière actinique sature les processus photochimiques et donc que l'oxygène modulée par le faisceau d'analyse ne sera alors plus détectable car la proportion de photon 'modulé' entrant dans la chaîne du transport d'électrons est alors infime par rapport au signal

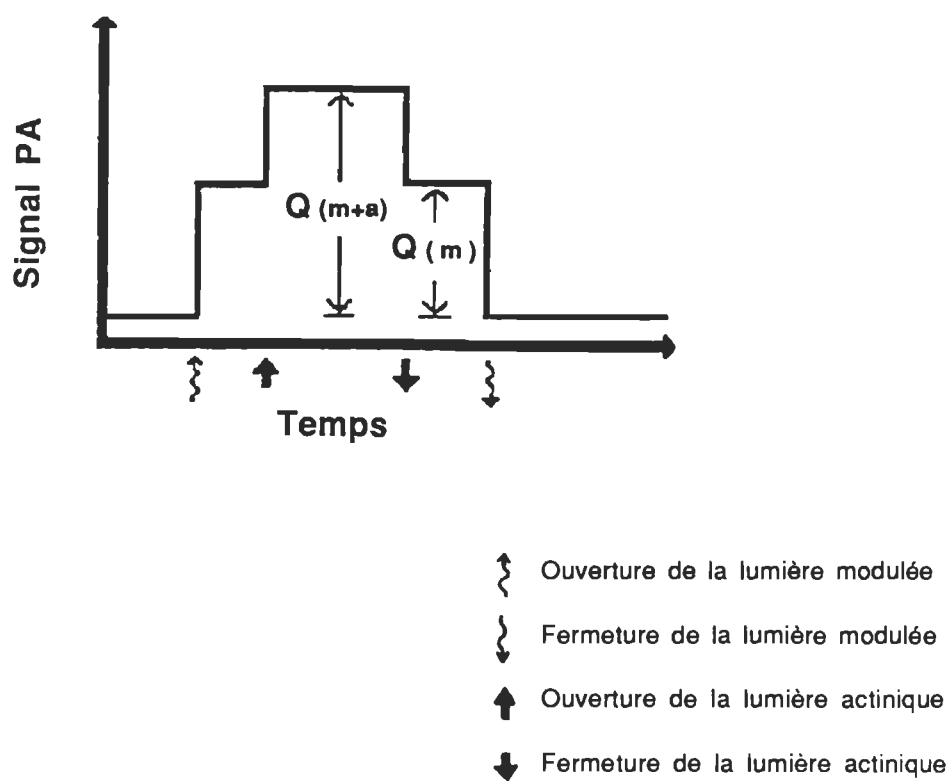


Figure 10: Signal photoacoustique d'une feuille photosynthétique: hautes fréquences (> 200 Hz).

thermique provenant des pigments (les photons 'non-modulés' prenant toute la place dans la chaîne photosynthétique).

Dans la figure 11, le trait plein représente le signal photoacoustique total et le trait en pointillé est le signal d'oxygène. En l'absence du faisceau actinique, le signal photoacoustique augmente à cause de la contribution de l'oxygène. Et en présence de la lumière saturante, le signal d'oxygène est alors soustrait et seulement le signal thermique est obtenu.

La quantification du signal d'oxygène et thermique se fait par calculs vectoriels (52). La différence majeure est que, ici, la valeur de la phase est utilisée dans le calcul du dégagement d'oxygène. Ceci est possible car l'utilisation d'une onde de modulation sinusoïdale donne une grande précision sur la valeur de la phase. Donc il est plus rapide de mesurer cette valeur ainsi que l'amplitude du signal photoacoustique pour déterminer la quantité d'oxygène émis. Cette quantité d'oxygène dégagée (en volt) par l'échantillon est donnée par la relation suivante:

$$A_{O_2} = \sqrt{(R_c - (T_c \cdot (1 - S.E.P.)))^2 + (R_s - (T_s \cdot (1 - S.E.P.)))^2} \quad (18)$$

où R_c est le signal en cosinus sans la présence du faisceau actinique ($R_c = M \cos \phi$) (volt); R_s est le signal en sinus sans la présence du faisceau actinique ($R_s = M \sin \phi$) (volt); T_c est le

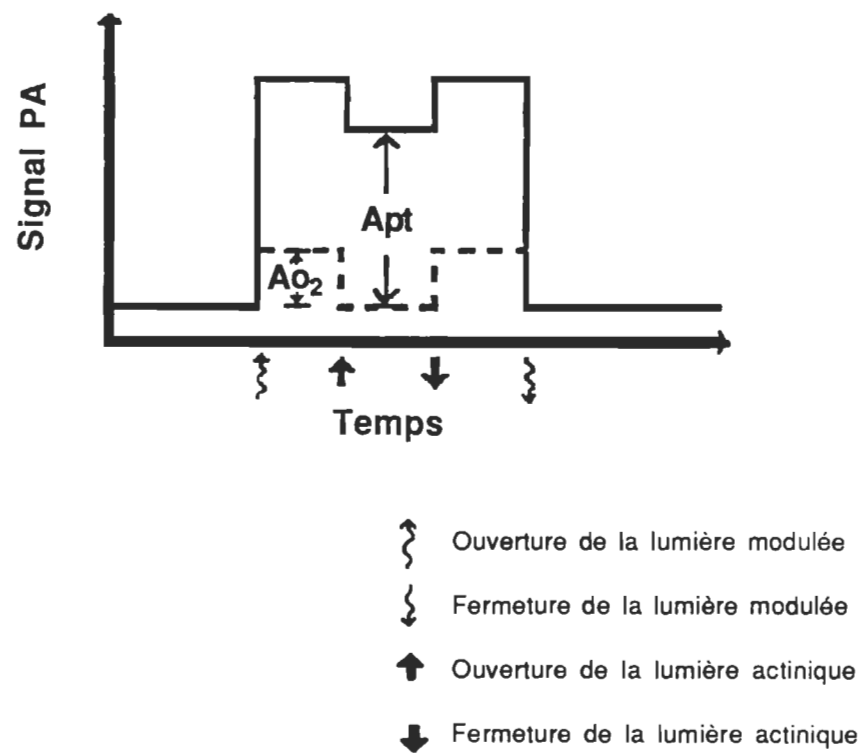


Figure 11: Signal photoacoustique d'une feuille photosynthétique: basses fréquences (< 200 Hz).

signal en cosinus avec la présence du faisceau actinique ($T_c = M \cos \phi$) (volt); T_s est le signal en sinus avec la présence du faisceau actinique ($T_s = M \sin \phi$) (volt); M est le signal PA total (volt); et ϕ est la phase du signal photoacoustique (degré). Dans la figure 11, A_{pt} est le signal PA en présence du faisceau actinique en volt. R_c , R_s , T_c et T_s sont calculés à partir du signal photoacoustique total, M , et de la phase du signal, ϕ . De plus, la valeur du stockage d'énergie photosynthétique, S.E.P. est celle trouvée à hautes fréquences avec l'équation 17.

La valeur de la phase peut aussi donner une autre information précieuse, soit le délai entre le signal de référence (i.e. faisceau incident modulé) et le maximum du signal photoacoustique. La figure 12 est la représentation schématique du délai. Le temps de délai, d , est calculé avec la relation 19

$$d = (\phi/360^\circ) \cdot f^{-1} \quad (19)$$

où ϕ est la valeur de l'angle de phase (degré) et f , la fréquence de modulation du faisceau modulé (Hertz).

La valeur du délai donne une information sur le temps de la génération du signal photoacoustique. Le délai sera dépendant des propriétés de l'échantillon (i.e. épaisseur, distance entre la surface de l'échantillon et le point de génération de l'émission thermique ou d'oxygène, densité, % d'eau qui est fonction du % de

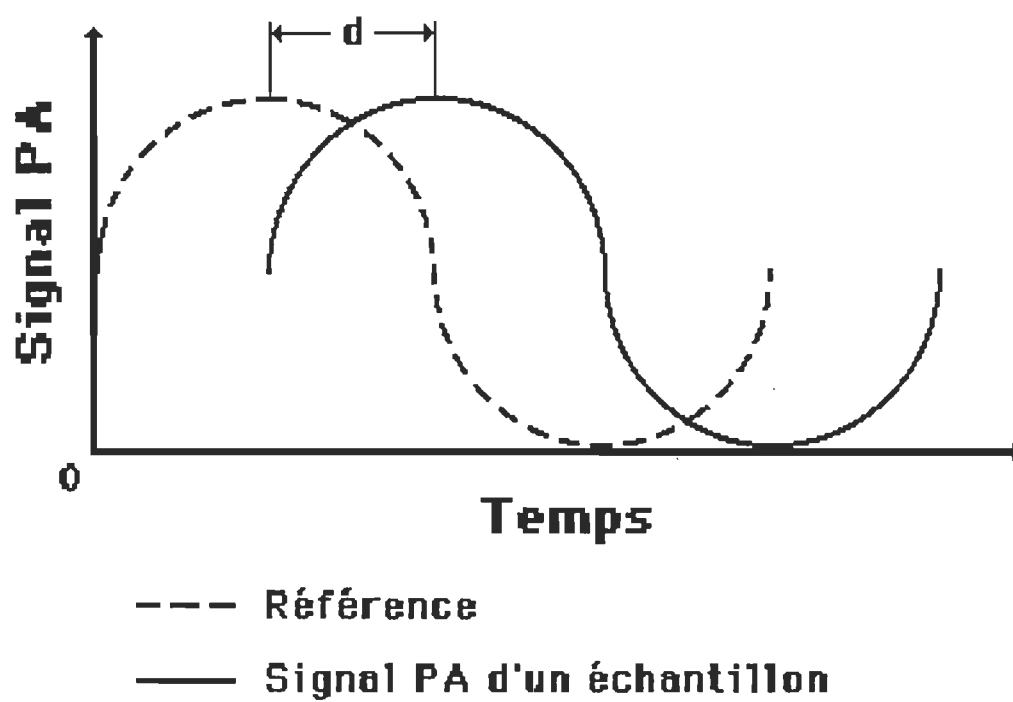


Figure 12: Représentation graphique du délai.

matière sèche, coefficient de diffusion thermique et coefficient de diffusion de l'oxygène). Mais il semble que le délai sera surtout dépendant des caractéristiques de diffusion de l'échantillon. Il existe une relation linéaire entre le signal photoacoustique et le délai du signal, dont la pente dépend du type de l'échantillon (optiquement et thermiquement différent). Il est aussi possible d'utiliser le délai pour normaliser le signal photoacoustique. En se faisant, le signal photoacoustique est rapporté à un même temps de diffusion pour chaque échantillon, donc approximativement à une même profondeur dans l'échantillon. Car la grandeur du délai dépend des propriétés de diffusion thermique et des gaz de l'échantillon. La valeur du délai pourrait devenir un autre outil accessoire pour mesurer le dépérissement des forêts, donnant ainsi des informations reliées à la morphologie de l'échantillon.

E. Mesures de la photosynthèse sur le terrain

Le but des mesures sur le terrain n'était pas seulement de 'prendre des mesures sur le terrain', mais aussi de vérifier si le montage pouvait supporter le transport, en plus de la vérification de prendre des mesures de façon autonome, c'est-à-dire si l'opérateur et l'appareil pouvait fonctionner en étant coupé de la civilisation.

Les mesures ont été effectuées le 27 et 28 septembre 1990, au Centre de recherche acéricole du Québec (Tingwick, Québec, Canada) sur trois arbres d'érable à sucre (*Acer saccharum*) dépéris à différents niveaux. Soit sur un arbre sain à 0% de dépérissement (#63), sur un arbre ayant une défoliation modérée, 40% de dépérissement (#55), et sur un arbre gravement atteint, 70% de dépérissement (#67). L'identification de l'état du dépérissement des arbres fut effectuée par des experts qualifiés, d'après un examen visuel.

Les échantillons foliaires furent tous pris sur les branches inférieures situées environ au sud. Pour chaque arbre six échantillons furent analysés, par les techniques de photoacoustique et de fluorimétrie.

1. Mesures de la fluorescence

La courbe de la cinétique de la fluorescence de la chlorophylle est prise en deux étapes: i) la montée rapide, et ii) la décroissance lente. La montée rapide de la fluorescence fut suivie pendant une seconde à une fréquence de 250 points/s, et la partie de la décroissance lente de la fluorescence pendant 120 secondes à une fréquence de 23 points/s. Chaque échantillon fraîchement coupé fut placé à l'obscurité, dans la cellule photoacoustique fermée, pendant 15 minutes avant la prise de données.

Lorsque le filtre dichroïque ($\lambda_{\text{ex}} < 505 \text{ nm}$) est placé devant la lampe actinique, le faisceau lumineux excitateur a une intensité de $72,7 \text{ W/m}^2$.

2 Mesures photoacoustiques

Après la mesure de la courbe de la cinétique d'induction de la fluorescence de la chlorophylle, le filtre dichroïque est retiré et chaque échantillon subit une analyse photoacoustique aux cinq fréquences suivantes: 10 Hz, 70 Hz, 130 Hz, 190 Hz, et 250 Hz. Une moyenne sur 50 points, à 5 points par seconde, était enregistrée pour chaque fréquence. Le temps de stabilisation avant la prise de données, pour chaque fréquence, était de 20 secondes.

Le faisceau d'analyse (i.e. lumière modulée) émettait avec une intensité de $1,01 \text{ W/m}^2$. L'intensité du faisceau actinique, était fixée à 845 W/m^2 . Avant la prise de données, l'échantillon de feuille était incubé, sous le faisceau d'analyse, pendant 20 secondes. La constante de temps sur l'amplificateur à verrouillage de phase était de une seconde et le facteur de multiplication du signal provenant de la cellule était de 64 (ce facteur se retrouve sur l'unité d'amplification de la cellule photoacoustique).

CHAPITRE IV

RÉSULTATS ET DISCUSSION

A. Résultats concernant la sensibilité et la performance de l'appareil portatif

1. Rapport signal/bruit

Mesure est synonyme d'observation d'un signal. Tous les signaux peuvent être examinés collectivement pour trouver et établir les règles et méthodes pour leur mesure. Par contre, chaque signal observé est associé avec un voisin que l'on nomme bruit. La proportion de bruit dans le signal mesuré variera selon le système de mesure employé et la grandeur du signal. Malgré tout le contrôle des paramètres, le bruit est souvent indésirable.

Les techniques pour soustraire le bruit du signal sont innombrables. Ces techniques peuvent être purement mathématiques comme électroniques. Cependant, il est important de mesurer la proportion de bruit par rapport au signal pour déterminer si le signal observé est statistiquement différent du bruit, si, en fait, il est significatif. En d'autres termes, on détermine la précision de la mesure.

On détermine donc le rapport du signal mesuré (S) sur le bruit (N) (58). Statistiquement, le rapport S/N est donné par la relation suivante:

$$\frac{S}{N} = \frac{\text{moyenne}}{\text{déviati on standard}} = \frac{1}{\text{déviati on standard relative}} \quad (20)$$

De cette équation, on note que plus le rapport sera élevé, plus grande sera la précision, car dans ce cas la déviati on standard est petite.

Le rapport S/N peut être estimé facilement à partir de la trace continue de l'enregistrement. Si la variation dans le signal enregistré est aléatoire, c'est-à-dire s'il s'agit d'un bruit blanc, tout écart de la moyenne ne devra être plus grand que 2,5 fois la valeur de la déviati on standard (N), ceci à 99% de confiance. Les écarts étant autant dans la partie positive que dans la partie négative par rapport à la moyenne, la valeur de la déviati on standard (N) peut être trouvée en prenant 1/5 de la variation minima-maxima du signal. Il est important de souligner que cette mesure doit être faite dans un temps suffisamment long pour que la trace soit bien représentative. Par exemple, pour un instrument ayant une constante de temps de 1 seconde, l'observation devrait être de 2 minutes.

La mesure du rapport signal/bruit doit être faite dans des conditions dites 'standards'. On se doit donc de définir ces conditions standards, selon l'appareil et l'échantillon utilisés, pour qu'une comparaison soit valable. En photoacoustique, le noir de carbone est un échantillon dit 'standard', car il est bien connu. Son utilisation pour la détermination du rapport signal/bruit se fait sous les conditions expérimentales trouvées dans le *tableau 5*.

Tableau 5

Conditions expérimentales pour la détermination de la sensibilité de la partie photoacoustique de l'appareil portatif.

Intensité modulée	4,07 W/m ²
Fréquence de modulation	130 Hz
Constante de temps	1 s
Échantillon	Carbon Lampblack (Fisher Scientific C-198)

La valeur du signal (S) est enregistrée en présence du faisceau d'analyse, tandis que celle pour le bruit (N) est déterminée en mesurant le signal photoacoustique mais sans la présence du faisceau d'analyse. Ainsi, l'enregistrement représentatif du signal photoacoustique montre que le rapport

signal/bruit est de l'ordre de 20 000 pour le photomètre photoacoustique. Il est cependant difficile de trouver la raison exacte pour l'obtention d'un rapport S/N aussi élevé. Ce n'est pas la cause d'une seule composante, mais l'ensemble du système servant à mesurer le signal photoacoustique, c'est-à-dire la diode électroluminescente modulée sinusoïdalement et électroniquement, la cellule photoacoustique, l'amplificateur à verrouillage de phase, etc. Le choix de ces composantes a contribué à l'obtention d'une sensibilité aussi élevée.

2. Inhibition de la photosynthèse avec DCMU.

La précision d'un appareil servant à mesurer la photosynthèse n'est pas le seul critère. Il faut s'assurer que l'appareil peut suivre les processus photosynthétiques dans un échantillon ayant une activité photochimique. Pour atteindre ce but, nous avons examiné l'inhibition de la photosynthèse par l'emploi du DCMU (3-(3,4-dichlorophényl)- 1,1- diméthylurée). Le DCMU est bien connu comme inhibiteur du transport d'électrons au niveau de Qb. En fait, le DCMU occupe le site de Qb sur D1, une protéine de 32 kDa du photosystème II. Si la photosynthèse est altérée par l'emploi d'un inhibiteur, la mesure de l'activité photosynthétique donnera un résultat différent de celui du contrôle.

Pour suivre les changements de l'activité photosynthétique, la partie photoacoustique ainsi que celle pour la mesure de la cinétique d'induction de la fluorescence (l'effet Kautsky) furent utilisées. Les conditions expérimentales sont trouvées au *tableau 6*.

Le pois est utilisé car il est bien connu photoacoustiquement et fluorimétriquement. Le traitement au DCMU fut effectué sur vingt disques de feuilles. Chaque disque fut pris à l'aide d'un emporte-pièce et par la suite poinçonné aléatoirement de trente trous minuscules fait avec une aiguille. Le DCMU diffuse beaucoup plus rapidement et facilement dans une feuille trouée que dans une feuille intacte. Huit feuilles ont servi pour les mesures photoacoustiques, six pour les mesures fluorimétriques et, pour les contrôles, trois feuilles en photoacoustique et trois en fluorimétrie. Chaque groupe de feuilles (traitées et contrôles) a été analysé avant un traitement d'une heure, par flottation sur; i) la solution de 50 μM de DCMU pour les traitements, et ii) la solution de 2% d'éthanol pour les contrôles. Suite au traitement, DCMU et EtOH, chaque échantillon fut analysé de nouveau sous les mêmes conditions qu'avant traitement.

Les résultats concernant la mesure de la photosynthèse en relation avec le traitement au DCMU, se trouvent dans le *tableau 7*.

Tableau 6

Conditions expérimentales pour la détermination
de la performance de l'appareil portatif.

• Solutions	
- Contrôle	2% EtOH
- Traitement	50 μ M DCMU dans 2% EtOH
• Photoacoustique	
- Intensité modulée	4,07 W/m ²
- Intensité actinique	303 W/m ²
- Fréquence de modulation pour la mesure de;	
S.E.P.	400 Hz
Apt	40 Hz
Ao ₂	40 Hz
• Fluorescence	
- Intensité à l'excitation	73 W/m ²
- Adaptation à la noirceur	15 min
• Échantillon	Pois (<i>Pisum sativum</i> L.)

Tableau 7

Résultats sur l'inhibition de la photosynthèse du pois
(*Pisum sativum* L.) par DCMU.

Photoacoustique:

S.E.P. (contrôle) $0,39 \pm 0,04$

S.E.P. (DCMU) $0,15 \pm 0,02$

61,5% d'inhibition

Ao₂/Apt (contrôle) $1,07 \pm 0,13$

Ao₂/Apt (DCMU) $0,31 \pm 0,08$

71,0 % d'inhibition

Fluorescence:

Rfd (contrôle) 740 nm $0,72 \pm 0,10$

Rfd (contrôle) 680 nm $1,07 \pm 0,11$

Rfd (DCMU) 740 nm $0,08 \pm 0,07$

Rfd (DCMU) 680 nm $0,12 \pm 0,08$

88,9 % d'inhibition (740 nm)

88,8 % d'inhibition (680 nm)

Les résultats du *tableau 7* montrent clairement que l'activité photosynthétique est inhibée par un traitement au DCMU. De plus, un traitement avec la solution de 2% EtOH ne change pas les caractéristiques photosynthétiques, mesurées par photoacoustique et par fluorimétrie. La réponse des contrôles ne variait pas avec le traitement dans la solution éthanoïque. En photoacoustique, le signal thermique, Apt, n'a pas changé après le traitement au DCMU.

La quantité Ao_2 normalisée au signal thermique (Ao_2/Apt) est vraiment représentative de la réduction de Q_b . En effet, l'oxygène provient du photosystème II et la séparation de charges dépend de l'état de la chaîne du transport d'électrons et plus particulièrement de Q_b . Q_b est l'accepteur d'électrons du côté oxydant du complexe du dégagement d'oxygène. La différence d'environ 20%, entre le pourcentage d'inhibition évalué pour le stockage d'énergie photosynthétique (S.E.P.) et celui trouvé par mesure de l'effet Kautsky serait due, croit-on, à la différence dans l'infiltration du DCMU dans les échantillon de feuille, car l'expérience photoacoustique a été faite indépendamment de celle fluorimétrique. L'autre hypothèse serait attribuée au fait que les deux méthodes (photoacoustique et fluorimétrique) ne mesurent pas exactement le(s) même(s) processus. Mais cette dernière hypothèse serait moins probable que la première.

La différence dans le pourcentage d'inhibition entre le stockage d'énergie photosynthétique (S.E.P.) et la quantité Ao_2 normalisée au signal thermique (Ao_2/Apt) est, croit-on fortement, due au stockage d'énergie du photosystème I. La valeur du dégagement d'oxygène étant reliée à l'intégrité de la chaîne photochimique entière montrera une inhibition plus grande que la valeur du stockage d'énergie, car si le photosystème I cyclique est fonctionnel (n'étant pas affecté par un traitement au DCMU), l'intensité d'inhibition trouvée avec le S.E.P. sera donc moins grande. Autrement dit, le 10% de différence entre le pourcentage d'inhibition trouvé avec S.E.P., et celui obtenu avec Ao_2/Apt serait, en partie, dû au transport cyclique du photosystème I. Cependant pour s'assurer que le dix pourcent de différence provient du photosystème I cyclique, il serait important de faire une flottation sur une solution de DBMIB (2,5-dibromo-3-méthyl-6-isopropyl-*p*-benzoquinone), après le traitement au DCMU, pour voir si le pourcentage d'inhibition rejoindrait celui trouvé avec Ao_2/Apt . Le DBMIB est un inhibiteur du transport cyclique d'électrons dans le photosystème I, et c'est une petite molécule soluble dans les membranes du chloroplastes et des thylacoïdes. Mais il y a un point où il faut être prudent: il ne doit y avoir aucune infiltration de solution par les pores de la feuille, sinon le dégagement d'oxygène ne pourra être mesuré.

Si effectivement la différence de 10% proviendrait, en partie, du stockage d'énergie dans le photosystème I cyclique,

ceci contredirait les conclusions de Herbert et coll. (59). Une des conclusions de leur étude souligne que les plantes supérieures en C_3 , comme c'est le cas du pois, n'auraient pas ou très peu de photosystème I cyclique. De plus, la méthode photoacoustique-DCMU serait beaucoup plus facile et rapide pour cette détermination.

B. Comment la forme de la modulation affecte le signal photoacoustique

La partie la plus importante en photoacoustique est le faisceau d'analyse. La lumière monochromatique modulée est la source même pour la génération de l'effet photoacoustique.

La majorité des montages expérimentaux utilisent un modulateur mécanique. Ce type de modulateur est constitué d'un disque à secteur installé sur un moteur à vitesse variable. Ce genre de disque donne, aux basses fréquences de modulation, une onde s'approchant de la forme carrée. Tandis qu'aux hautes fréquences de modulation, la forme de l'onde est plutôt triangulaire. D'autres montages utiliseront un modulateur électronique ayant une onde carrée pour la forme de la modulation du faisceau d'analyse. Dans ce cas, la forme de l'onde aura la même forme en fonction de la fréquence. L'appareil portatif présenté dans ce mémoire est le seul montage, connu à ce jour, utilisant une forme sinusoïdale de la modulation.

La théorie photoacoustique de l'état solide de Rosencwaig et Gersho (37) étant entièrement basée sur une forme de la modulation sinusoïdale, quel serait alors l'effet, sur le signal photoacoustique, de l'utilisation d'une autre forme à la modulation?

1. Avec le noir de carbone

Le test que tout les photoacousticiens utilisent pour vérifier le bon fonctionnement de leur appareil, est la relation liant le signal photoacoustique à la fréquence. La théorie RG (37) prévoit une relation linéaire (sur graphique log-log) dont la pente serait de -1, dans le cas de solide thermiquement mince, et de -3/2 pour les échantillons thermiquement épais. Est-ce que la valeur de la pente, pour un échantillon thermiquement mince, varierait si l'on changeait la forme de la modulation. Selon la démonstration faite au chapitre II (partie théorique), la valeur de la pente, pour la relation signal photoacoustique-fréquence, ne changera pas car la valeur de la pente n'est dépendante que de l'exposant de la fréquence angulaire (voir équation 14).

Les mesures sur le noir de carbone que nous utilisons comme standard pour la relation entre le signal photoacoustique et la fréquence, selon la forme de la modulation, furent faites sous les conditions présentées au *tableau 8*.

Tableau 8

Conditions expérimentales pour l'étude de la relation entre le signal photoacoustique et la fréquence, selon la forme de la modulation sur l'échantillon standard, le noir de carbone.

Intensité modulée	2,00 W/m ²
Forme de la modulation	sinusoïdale triangulaire carrée
Constante de temps	1 s
Échantillon	Carbon Lampblack (Fisher Scientific C-198)

Et les résultats (figure 13) montrent bien que la valeur de la pente est indépendante de la forme de la modulation, confirmant ainsi les prédictions de la théorie.

Cependant les ordonnées à l'origine, dans ce graphique, sont différentes pour les trois formes de la modulation: soit 0,945 pour l'onde carrée; 0,837 pour l'onde sinusoïdale; et 0,734 pour l'onde triangulaire. La valeur de l'ordonnée à l'origine est directement proportionnelle au signal photoacoustique total.

Le signal photoacoustique étant relié à l'intensité du faisceau modulé, une étude sur l'intensité de la lumière monochromatique d'analyse fut effectuée. L'étude consistait à mesurer l'intensité lumineuse de la lumière modulée à l'aide d'une photodiode (la photodiode répondant proportionnellement et linéairement à l'intensité lumineuse). L'intensité et la fréquence du faisceau monochromatique étaient constantes: $4,04 \text{ W/m}^2$ et 100 Hz respectivement. Et un graphique du signal à la photodiode en fonction de la forme de la modulation (figure 14) montre que l'intensité lumineuse arrivant à l'échantillon est dépendant de la forme de l'onde.

Intuitivement, on peut démontrer que l'aire sous la courbe de la modulation sera proportionnelle à la densité de photons arrivant au détecteur. La figure 15 résume bien le phénomène. Notons que le signal photoacoustique atteindra un maximum que

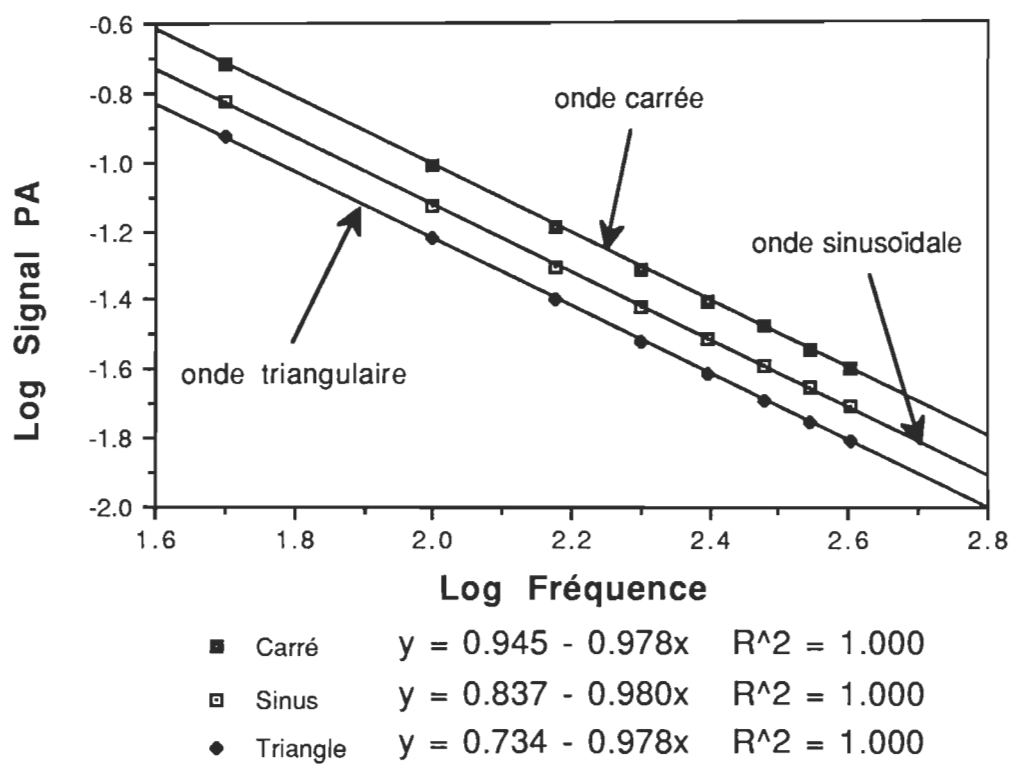


Figure 13: Effet de la forme de la modulation sur la valeur de la pente et de l'ordonnée à l'origine du graphique Log-Log (noir de carbone).

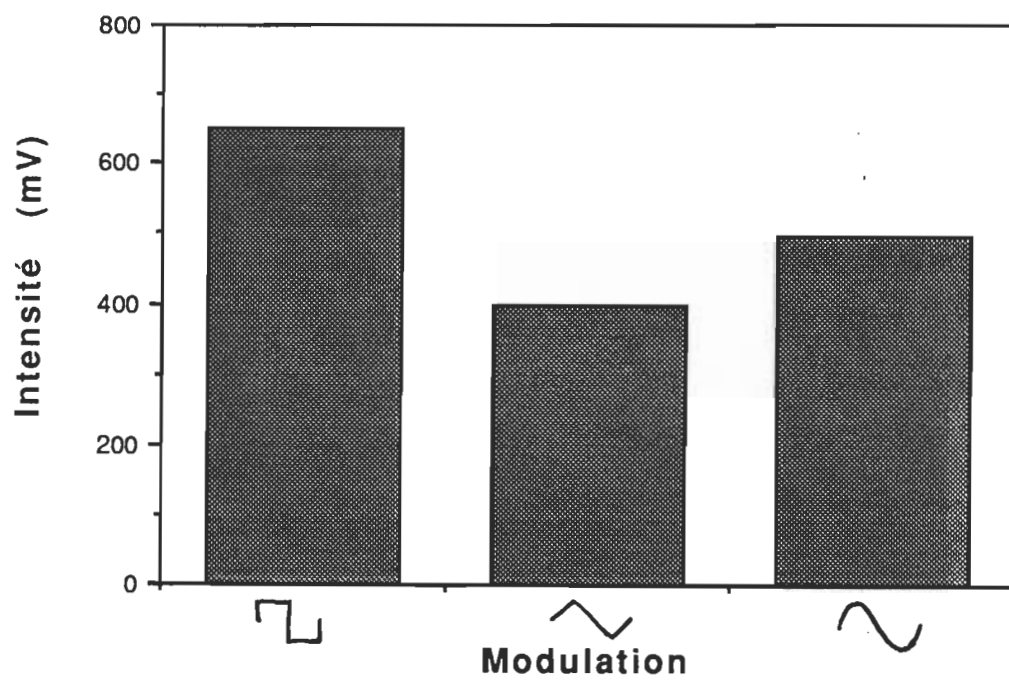


Figure 14: Intensité relative des formes de la modulation mesurée par photodiode.

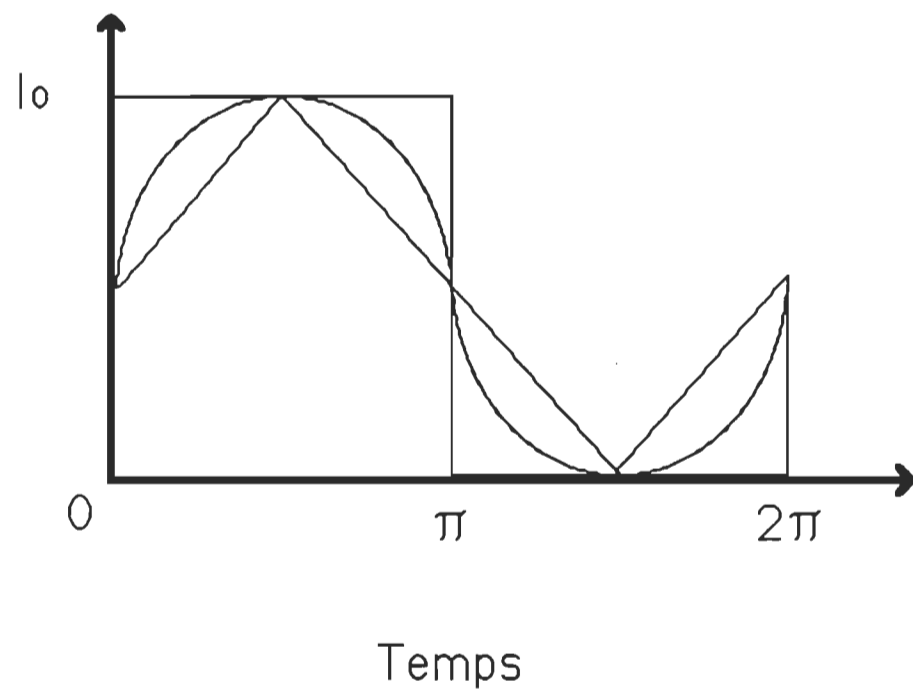


Figure 15: Intensité relative à la forme de la modulation.

dans la première moitié d'un cycle de modulation. Pour un demi-cycle (π) et une intensité du faisceau incident (I_0) constante, on voit que l'onde carrée possède une surface beaucoup plus grande que l'onde sinusoïdale, qui est plus grande que l'onde triangulaire. De plus, l'aire de l'onde carrée est, en théorie, exactement deux fois plus importante que l'onde triangulaire. Dans un cas idéal, le rapport des amplitudes trouvées sous ces deux formes de la modulation sera de 2. Mais, en pratique, il y a une certaine déviation due aux phénomènes de saturations partielles des détecteurs, perte dans la génération du signal (i.e. effet photoélectrique et effet photoacoustique), et autres phénomènes provenant de la constante de temps de l'appareillage, tous se traduisant par une perte de signal, plus ou moins importante, selon la forme de la modulation.

Si l'on prend le rapport des ordonnées à l'origine, du graphique de la figure 13, de la forme carrée sur la forme triangulaire, on trouve 1,3. Maintenant si on suit la même procédure, mais avec les intensités prises avec la photodiode, le rapport est de 1,6. Bien entendu, le résultat trouvé avec la photodiode se rapproche beaucoup plus du rapport de 2 (trouvé avec le raisonnement intuitif). Il semble donc que la forme de la modulation ait une influence plus importante sur l'effet photoacoustique.

Une étude avec le délai (chapitre III, équation 19) montre deux faits intéressants. Premièrement, la relation entre le signal photoacoustique total et le délai (sur des échelles linéaires), donne une droite ayant un grand coefficient de corrélation. Et il semble que la valeur de la pente sera dépendante des propriétés optiques et thermiques de l'échantillon. Une étude de l'équation de la droite de cette relation donne une pente d'environ 30 à 35 pour un noir de carbone, et environ 0,5 à 1,5 avec le pois (*Pisum sativum* L.). Deuxièmement, la valeur de la pente de cette relation en fonction de la forme de la modulation (figure 16, 17, et 18) donne le même résultat que lorsque la photodiode fut utilisée (figure 19). Le rapport de la pente trouvée avec l'onde carrée sur celle calculée avec l'onde triangulaire donne 1,6.

Donc, ceci démontre bien que le signal photoacoustique normalisé avec le délai est vraiment proportionnel à la quantité de photons absorbés par l'échantillon. Le fait de corriger avec le délai du signal compense pour les pertes dues au phénomène photoacoustique. Ce qui n'est pas le cas si on prend le signal photoacoustique total seulement.

2. Avec un échantillon photosynthétique

On sait que le signal photoacoustique mesuré avec le noir de carbone est proportionnel à l'intensité lumineuse de la source

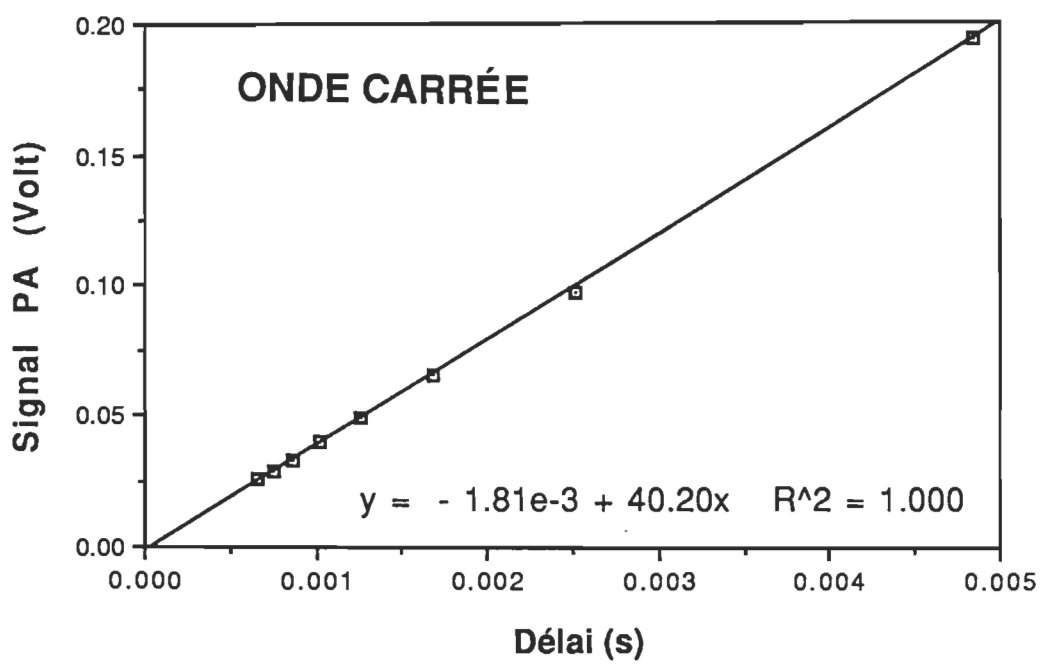


Figure 16: Effet de la forme de la modulation sur le rapport signal PA/délai (noir de carbone): onde carrée.

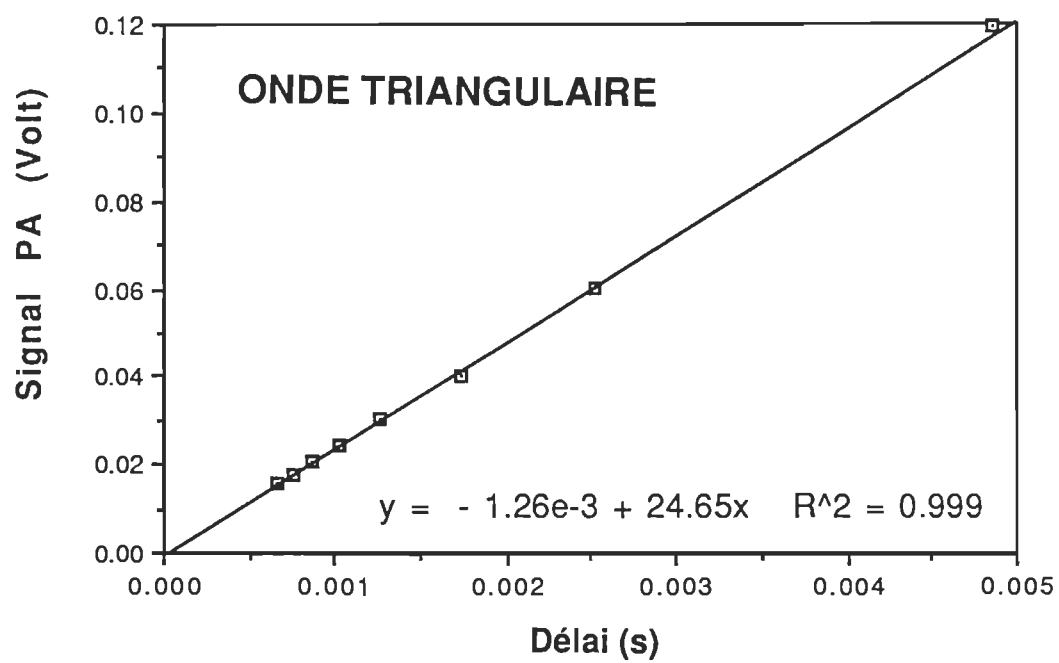


Figure 17: Effet de la forme de la modulation sur le rapport signal PA/délai (noir de carbone): onde triangulaire.

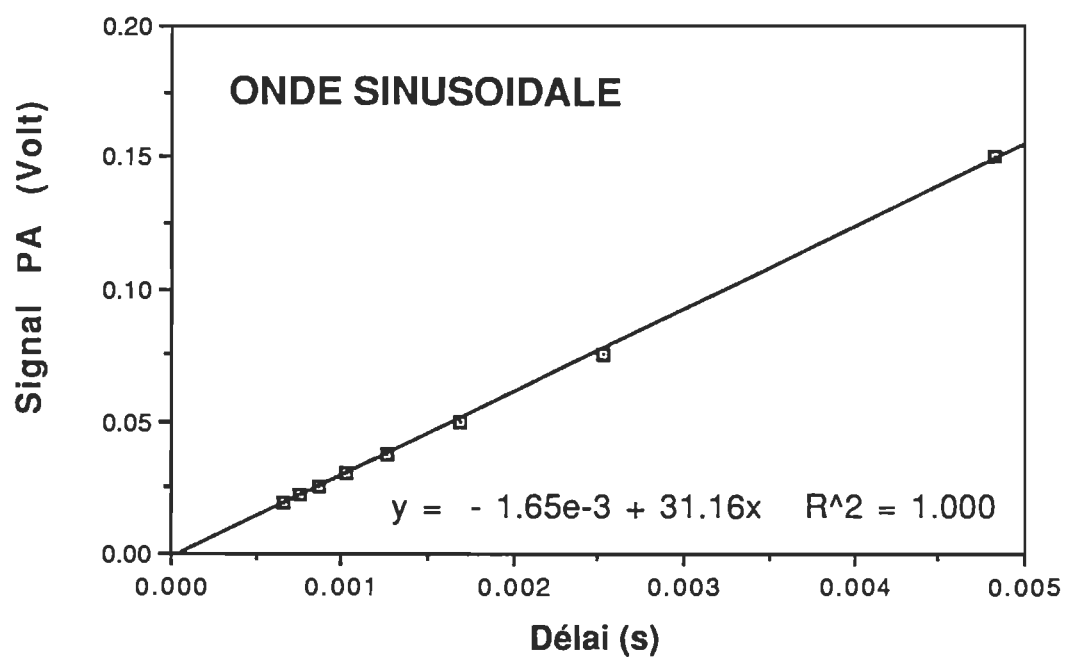


Figure 18: Effet de la forme de la modulation sur le rapport signal PA/délai (noir de carbone): onde sinusoïdale.

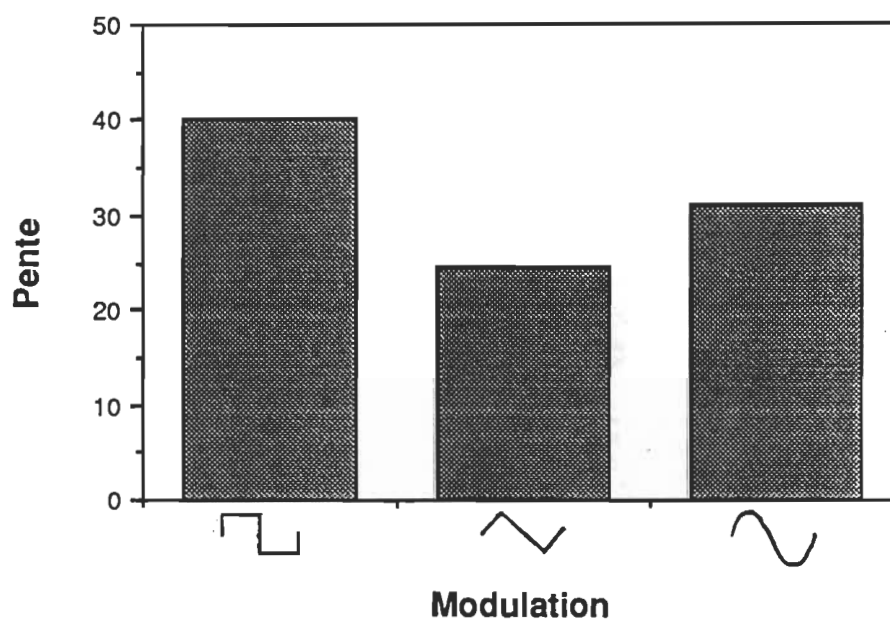


Figure 19: Pente du graphique signal PA en fonction du délai selon la forme de modulation.

modulée, ceci pour une forme de modulation constante. Et on sait, aussi, que l'intensité du signal photoacoustique sera différente si la forme de la modulation change, pour un I_0 constant.

Mais quel sera l'impact de la forme de la modulation du faisceau d'analyse sur les mesures du signal thermique (Apt), le stockage d'énergie photosynthétique (S.E.P.), le dégagement d'oxygène (A_{O_2}), et le signal du dégagement d'oxygène normalisé par rapport au signal thermique (A_{O_2}/A_{pt})?

L'étude fut effectuée sur quatre échantillons de pois (*Pisum sativum* L.), sous les conditions suivantes (tableau 9):

Tableau 9

Conditions expérimentales pour la mesure de l'effet de la forme de la modulation sur les paramètres photosynthétiques.

Intensité modulée	2,00 W/m ²
Intensité actinique	223 W/m ²
Fréquence de modulation pour la mesure de;	
S.E.P.	400 Hz
Apt	50 Hz
A_{O_2}	50 Hz

Le signal thermique (figure 20) suit la relation trouvée par le raisonnement intuitif, selon lequel l'intensité est proportionnelle à l'aire sous la courbe de la modulation (figure 15). Statistiquement, l'erreur relative sur la moyenne de Apt étant de 13%, les résultats sont différents de l'une à l'autre forme de la modulation. Mais dans le cas des trois autres paramètres photoacoustiques, soit le S.E.P. (figure 21), Ao_2 (figure 22), et Ao_2/Apt (figure 23), les résultats ne sont pas statistiquement différents, l'erreur relative étant trop grande (entre 15% et 50%). Cependant, si les erreurs peuvent être diminuées en augmentant le nombre d'échantillons, le stockage d'énergie photosynthétique trouvé sous une onde carrée pourrait être différent de ceux trouvés sous les deux autres formes de la modulation. Et dans le cas de Ao_2 , les trois formes donneraient des résultats différents, car les moyennes ont des tendances différentes, semblables à Apt.

Photosynthétiquement, est-ce que la forme de la modulations influencerait les proportions des signaux (p.ex. Ao_2 , Apt) détectées par la technique de photoacoustique? Pour vraiment répondre à la question, l'expérience suivante devra être effectuée.

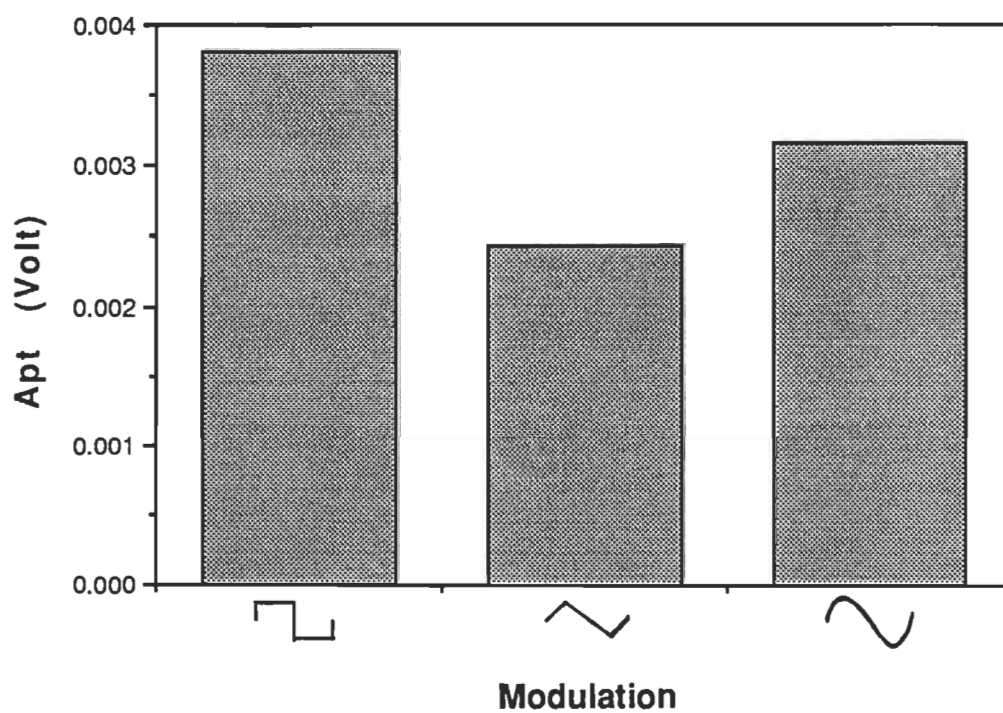


Figure 20: Effet de la forme de la modulation sur le signal thermique (pois).

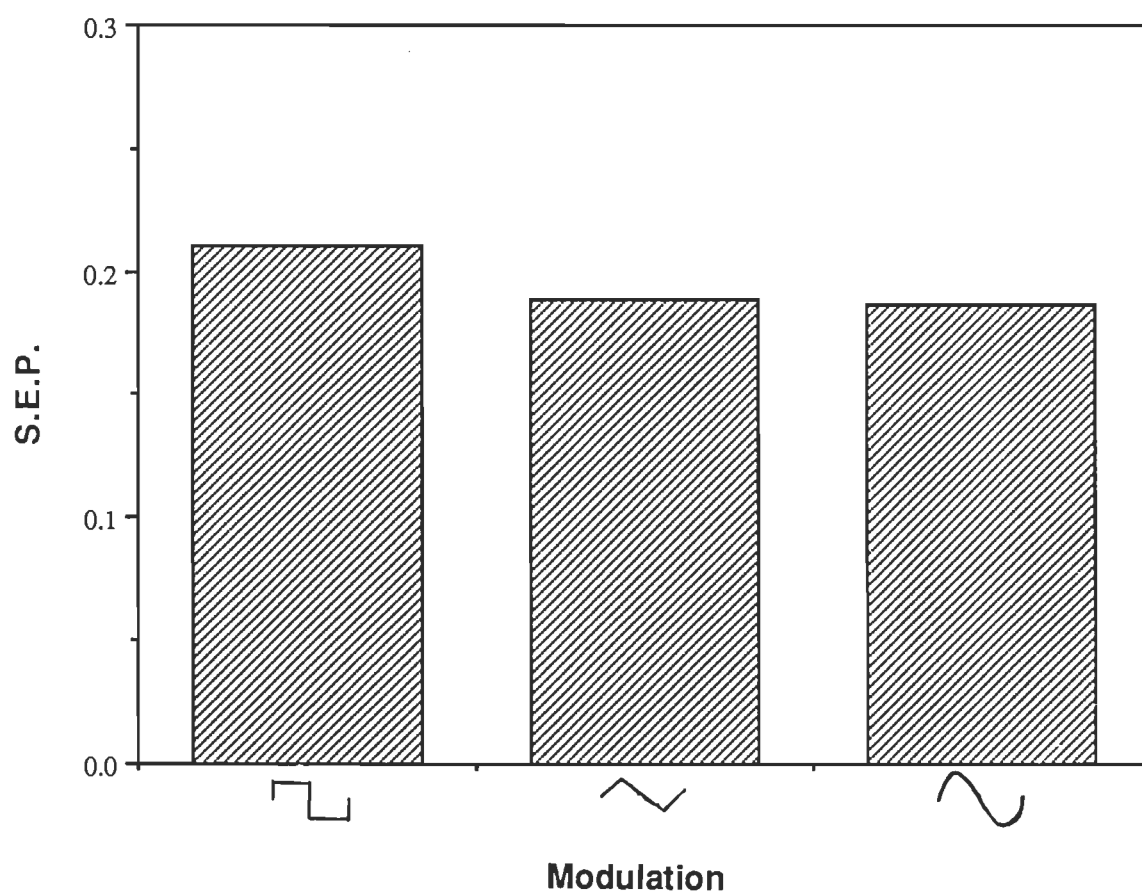


Figure 21: Effet de la forme de la modulation sur le stockage d'énergie photosynthétique (pois).

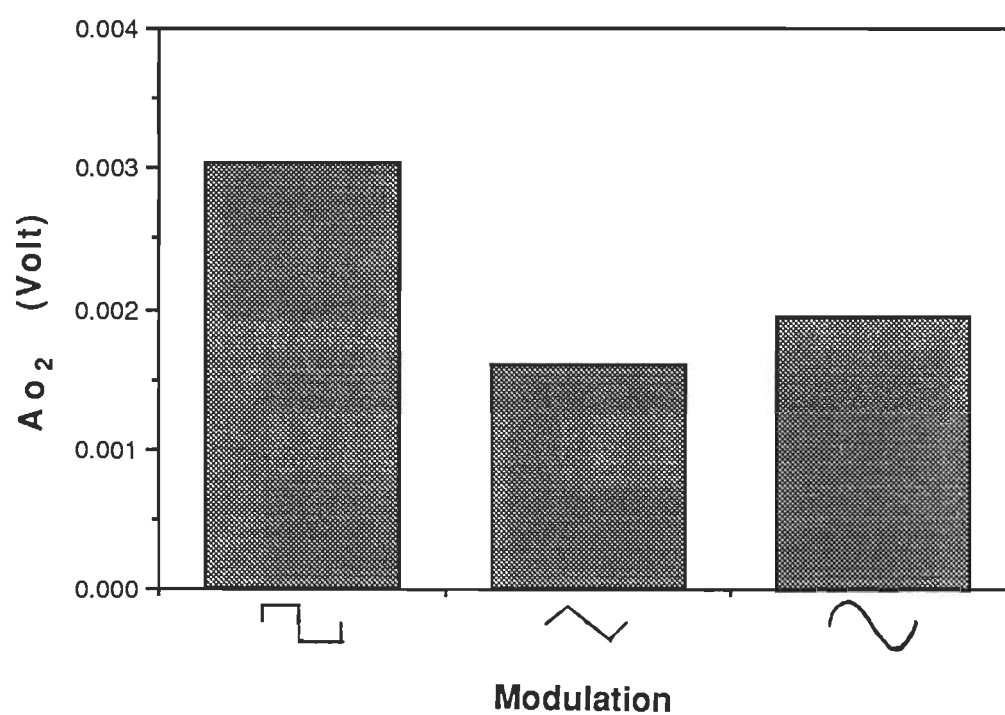


Figure 22: Effet de la forme de la modulation sur le signal d'oxygène (pois).

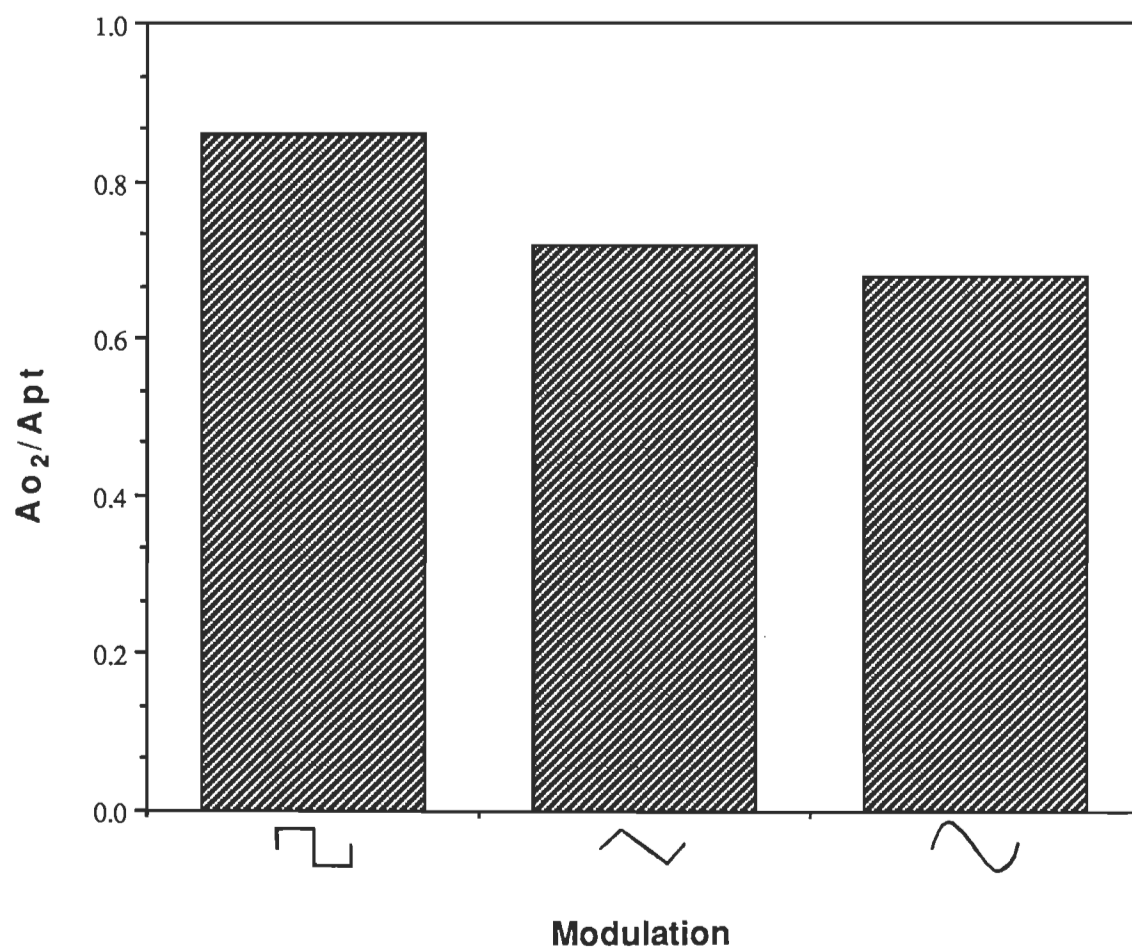


Figure 23: Effet de la forme de la modulation sur la quantité A_{O_2} normalisée au signal thermique (pois).

Les mesures photoacoustiques devront se faire sur plusieurs échantillons photosynthétiques. L'intensité lumineuse du faisceau d'analyse (I_0) devra être ajustée, non pas à la même intensité, mais à la même quantité de photons, pour toutes les formes de la modulation, c'est-à-dire la même aire sous la courbe pour chaque forme (ceci serait ajusté avec une photodiode). Ainsi, seulement l'effet de la forme de la modulation sur les processus photosynthétiques serait étudié.

3. Suggestions pour minimiser l'effet de la forme de la modulation

On comprend bien que pour les appareils photoacoustiques utilisant une source lumineuse difficilement modulable électroniquement avec une forme sinusoïdale, le modulateur mécanique sera employé. Dans ce cas, l'effet de la forme de la modulation aura un effet important, surtout si une étude dans le domaine des fréquences est entreprise, car la forme de la modulation change avec la vitesse de rotation du disque à secteur.

Pour minimiser l'effet de la forme de la modulation sur les résultats photoacoustiques, deux suggestions sont énoncées, soit

- 1) dans les cas où la forme de la modulation change avec la fréquence du faisceau d'analyse, une calibration de l'intensité devra être faite pour toutes les fréquences utilisées, et
- 2) une normalisation du signal photoacoustique en fonction de l'intensité du faisceau modulé ou en fonction du délai du signal photoacoustique, d (équation 19), est fortement conseillée.

En corrigeant ainsi le signal photoacoustique, on s'assure d'obtenir des résultats reproductibles, et de plus, c'est un pas de plus vers la mesure absolue du signal photoacoustique.

C. L'effet négatif du faisceau actinique

À titre de rappel, un échantillon photosynthétique montre des niveaux différents dans le signal photoacoustique si une lumière blanche saturante et non-modulée est ajoutée au faisceau d'analyse (figure 24). Chez les plantes, 'l'effet négatif' du faisceau actinique est observé aux basses fréquences de modulation avec certaines espèces, p.ex. le tabac, le pois, le maïs, sauf pour l'érable à sucre et le pin. L'effet négatif serait dû à une faible production d'oxygène par la feuille.

Cependant 'l'effet négatif' du faisceau saturant fut mesuré sur plusieurs matériaux ne montrant aucune activité photosynthétique. De plus, la proportion de l'effet varie selon le matériel analysé. Comme le démontre le *tableau 10*.

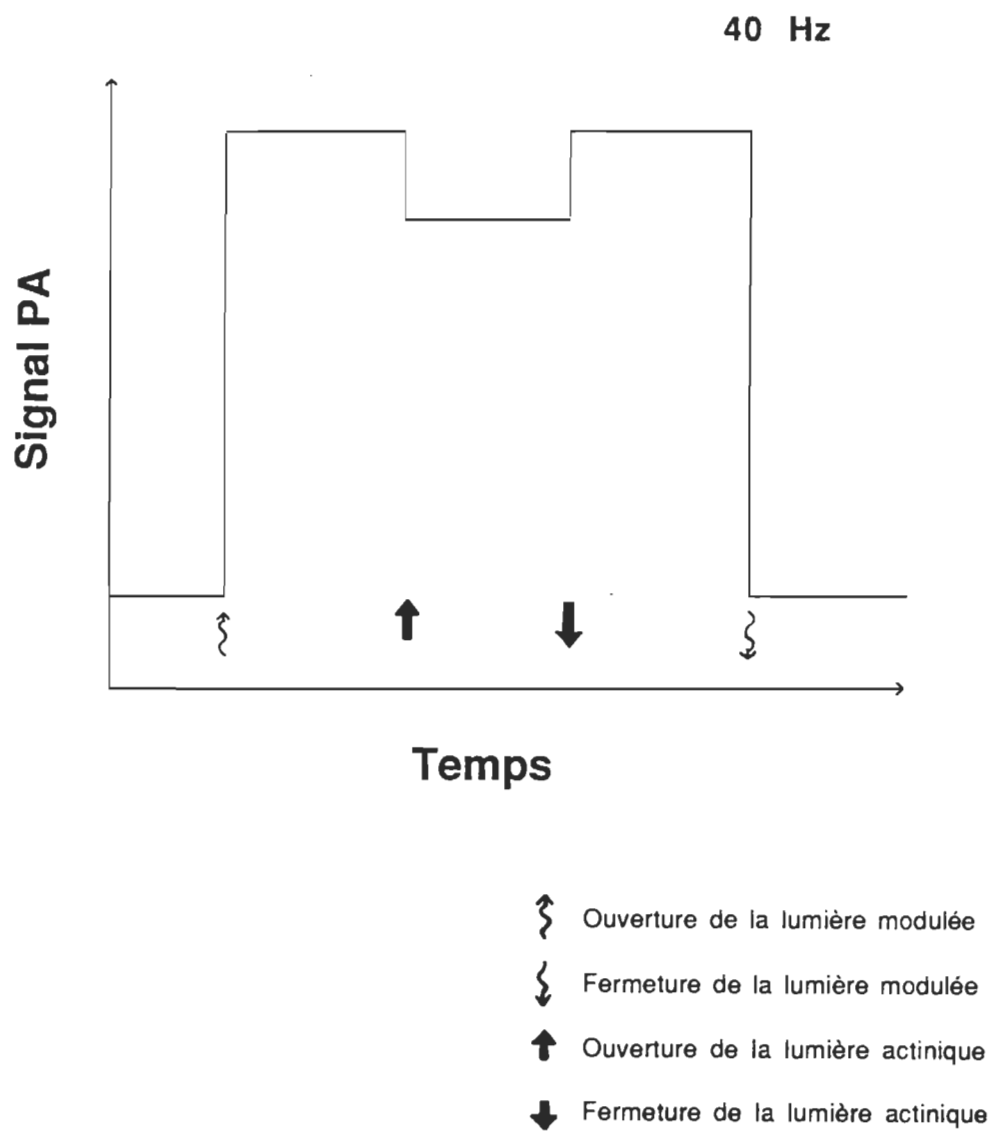


Figure 24: Effet du faisceau actinique sur le signal photoacoustique.

Tableau 10

Effet négatif du faisceau actinique pris sur des échantillons
n'ayant aucune activité photosynthétique.

<u>Matériel</u>	<u>% d'effet négatif†</u>
Tissu noir	6,27 ± 0,07
Caoutchouc noir	3,3 ± 0,9
Noir de carbone (poudre)	17,3 ± 0,2
Feuille d'érable sèche	6,7 ± 0,9
Feuille d'érable humide	19 ± 3

† Ces résultats ont été pris sous un faisceau modulé, de 4,7 W/m², à 25 Hz; l'intensité de la lumière actinique était de 846 W/m²; la moyenne est effectuée sur 5 essais.

L'étude de l'effet du faisceau actinique fut faite avec notre échantillon standard, le noir de carbone (Carbon Lampblack, Fisher Scientific C-198). Le noir de carbone est un corps noir, donc il absorbe une très grande quantité de photons. Cette expérience a pour but de déterminer: i) la source de l'effet, ii) l'explication physique du phénomène, et iii) la quantification de l'observation par la théorie photoacoustique.

L'effet de l'intensité de la lumière modulée sur le signal photoacoustique montre qu'aux basses fréquences, (figure 25) le signal photoacoustique, normalisé avec l'intensité du faisceau

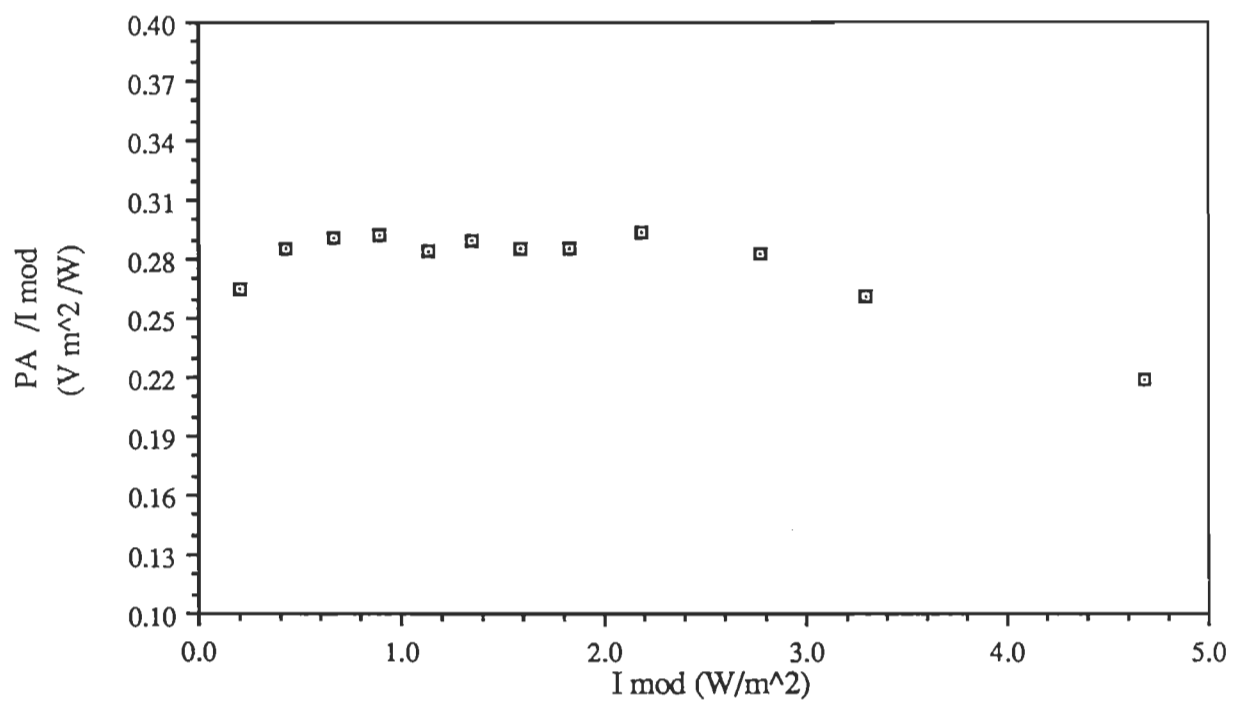


Figure 25: Effet de la lumière modulée sur le signal photoacoustique: basses intensités.

d'analyse, demeure constant sauf au-delà d'environ 3,5 W/m². Pour vérifier si effectivement le signal photoacoustique diminuait sous de hautes intensités modulées, des mesures ont été faites avec un laser He-Cd (qui peut produire un faisceau de 2 000 W/m²) à l'aide du montage de la figure 26. Le faisceau laser était modulé par un modulateur mécanique. Un polariseur servait à changer l'intensité de la lumière modulée. Après réflexion sur un miroir focalisant 2 à 1, le faisceau d'analyse parvenait à l'échantillon contenu dans la cellule photoacoustique. Le signal était alors mesuré avec l'amplificateur à verrouillage de phase et, effectivement, le signal photoacoustique corrigé (avec l'intensité du faisceau modulé) diminue avec l'augmentation de l'intensité de la lumière intermittente (voir figure 27).

L'étude de l'effet négatif du faisceau actinique fut alors effectuée avec l'appareil portatif. La figure 28 montre qu'en fonction de l'intensité du faisceau saturant, l'effet négatif augmente linéairement en proportion (ceci est obtenu sous un faisceau d'analyse d'intensité constante (4,7 W/m²) et à une fréquence de modulation de 25 Hz).

L'effet négatif est calculé avec l'équation suivante

$$(Q_m - Q_{(m+a)})/Q_m \quad (21)$$

où Q_m et $Q_{(m+a)}$ ont les mêmes définitions que dans l'équation 17.

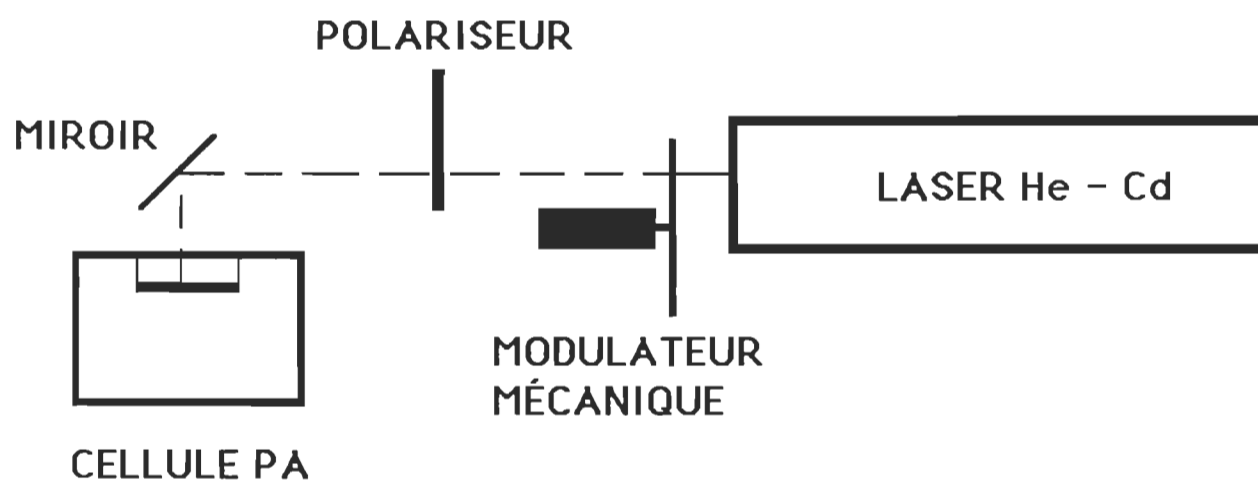


Figure 26: Système pour la mesure du signal photoacoustique à de hautes intensités modulées.

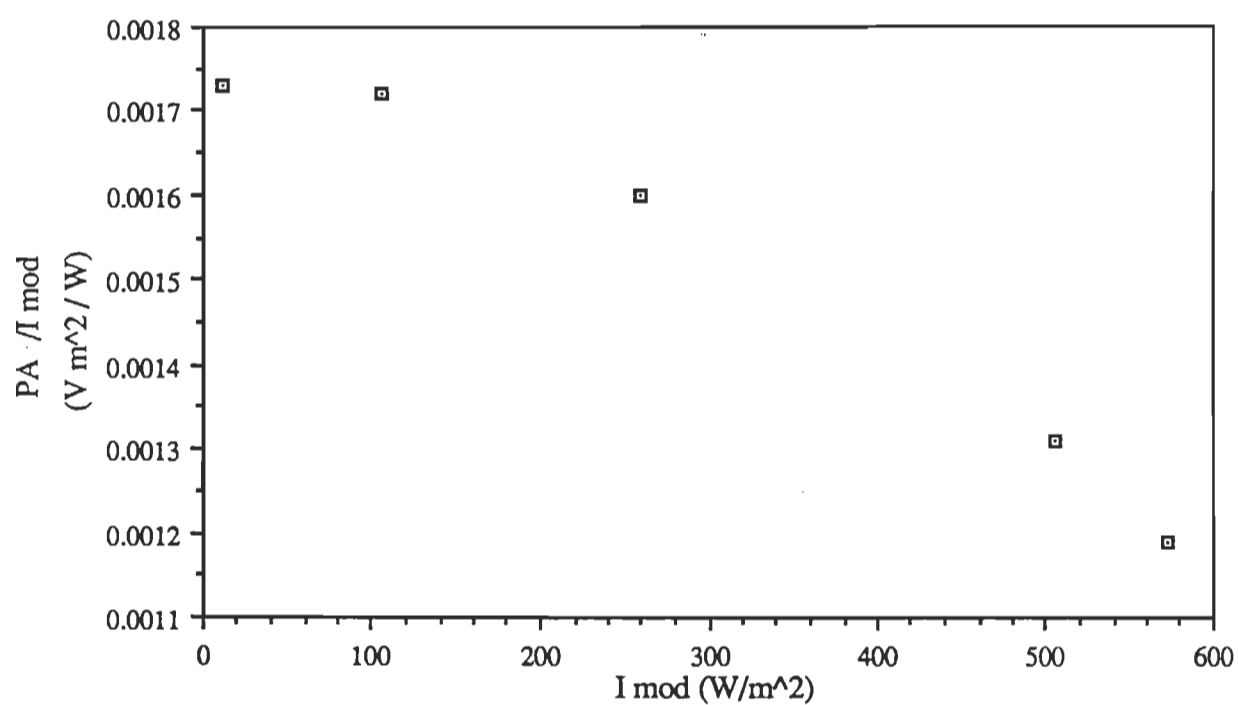


Figure 27: Effet de la lumière modulée sur le signal photoacoustique: hautes intensités.

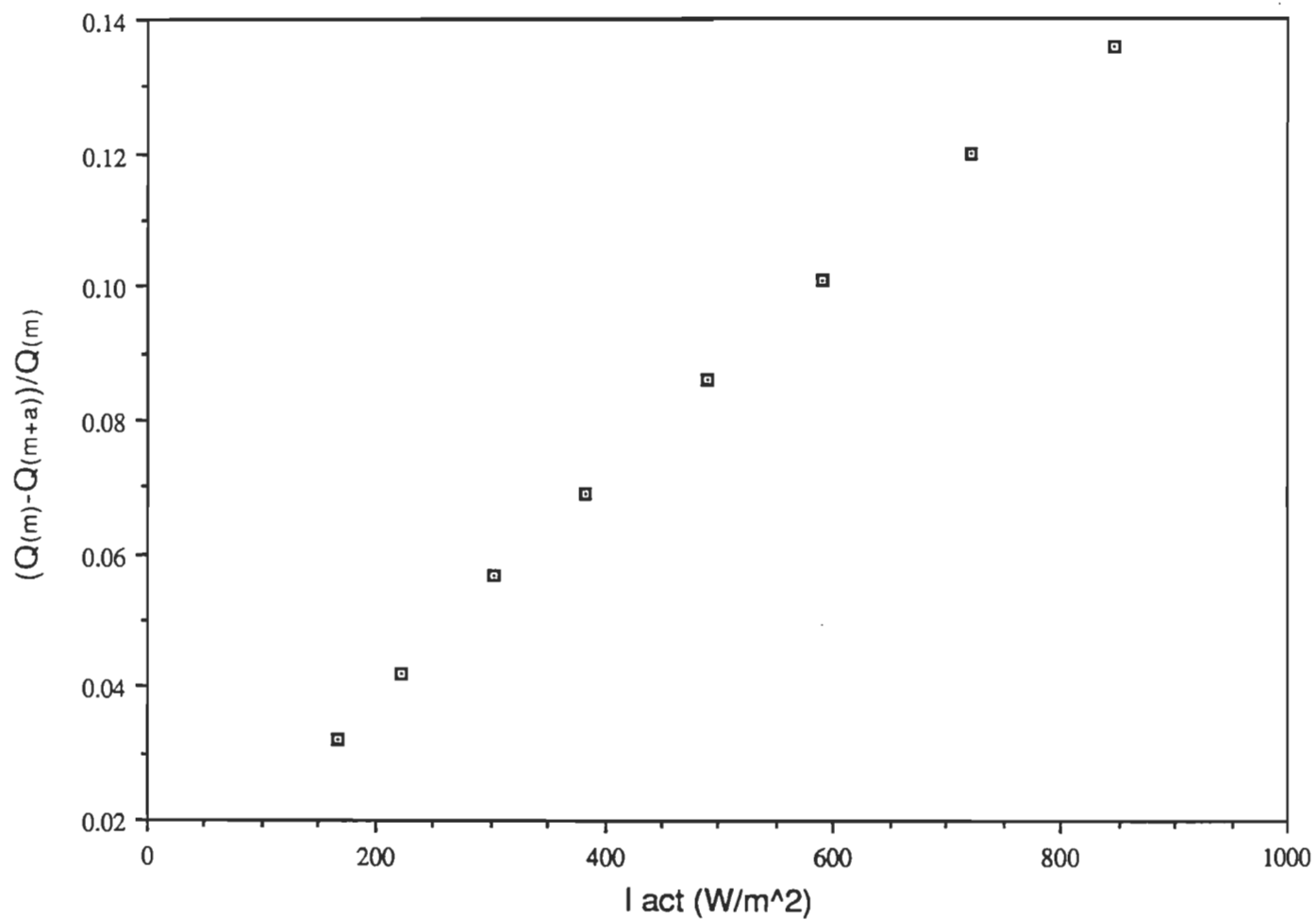


Figure 28: Effet du faisceau actinique en fonction de l'intensité de la lumière actinique.

Les résultats de la figure 28 montrent très bien que le phénomène provient de l'action du faisceau actinique et que l'amplitude du signal photoacoustique diminue linéairement avec l'augmentation de l'intensité de la lumière saturante. De plus, le phénomène induit par le faisceau actinique est indépendant de la fréquence de la modulation du faisceau d'analyse comme le montre la figure 29, qui fut obtenue avec une lumière modulée de $4,7 \text{ W/m}^2$, et un faisceau actinique de 846 W/m^2 .

Ces études préliminaires ont permis de montrer que le faisceau actinique induit un effet négatif sur les matériaux photosynthétiquement inertes. La perte de signal photoacoustique observée à de 'hautes' intensités intermittentes tient probablement du même phénomène.

Mais à quoi est dû cet effet? Est-ce l'échauffement du solide par la lumière blanche du faisceau actinique? Quelle serait la région pour laquelle cet effet serait négligeable par rapport à l'effet observé (p.ex. dégagement d'oxygène)?

1. Correction à la théorie photoacoustique

Maintenant que la source du phénomène de l'effet négatif est connue, la compréhension et la quantification du phénomène

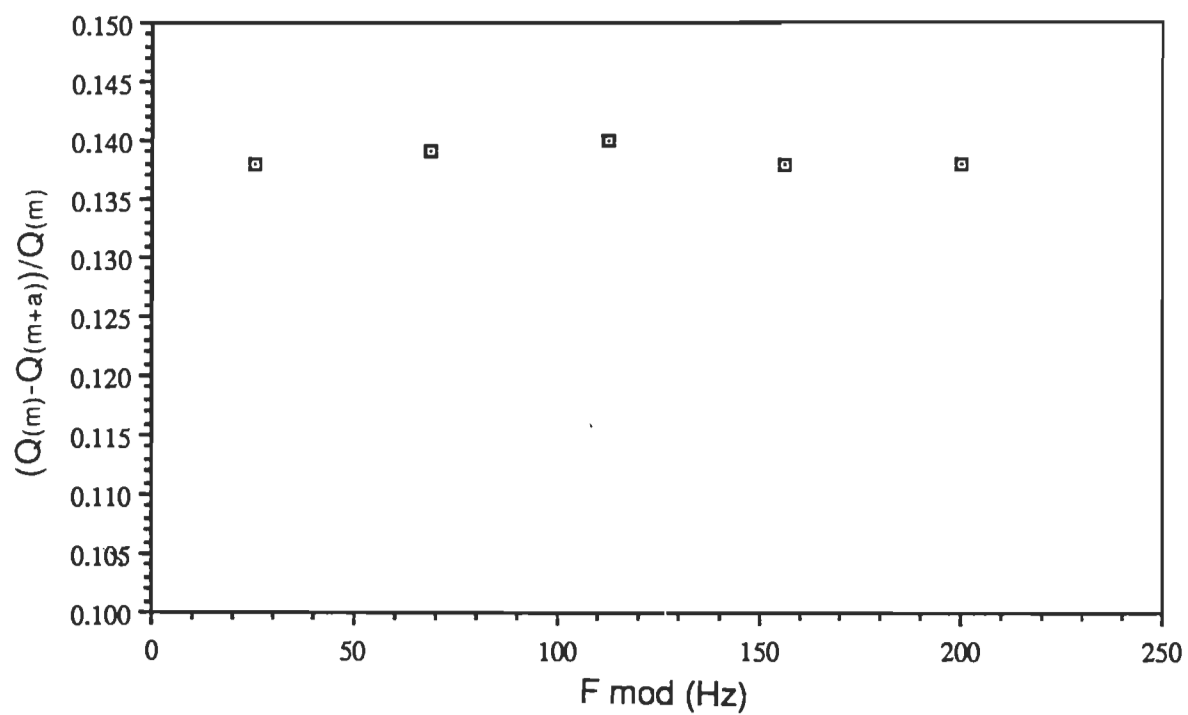


Figure 29: Effet du faisceau actinique en fonction de la fréquence de modulation du faisceau d'analyse.

doit se faire à l'aide de mesures expérimentales et de la théorie photoacoustique de Rosencwaig et Gersho (37).

La compréhension du phénomène s'est faite à partir d'une série de mesures qui ont été enregistrées avec l'appareil portatif. La série de courbes présentées à la figure 30 furent obtenues en mesurant, sur le noir de carbone de Fisher, l'amplitude du signal photoacoustique lorsque les intensités de la lumière modulée et celles du faisceau actinique étaient variées. Ce graphique montre bien l'effet négatif en fonction de l'intensité de la lumière saturante (différence entre chaque courbe). Mais, de plus, l'amplitude du signal photoacoustique ne varie pas linéairement avec l'intensité du faisceau d'analyse. Selon la théorie photoacoustique et l'équation 12, le signal mesuré doit être linéairement proportionnel avec l'intensité du faisceau modulé.

Pour respecter la théorie et pour n'étudier que l'effet du faisceau actinique, on se doit de trouver, dans la figure 30, une région où la linéarité est à son maximum. Une étude de la corrélation nous montre que la région entre $0,9 \text{ W/m}^2$ et $2,9 \text{ W/m}^2$, pour le faisceau d'analyse, est la plus linéaire. La figure 31 est le résultat de l'étude de la partie linéaire, et ces courbes ont un coefficient de corrélation d'environ 0,998.

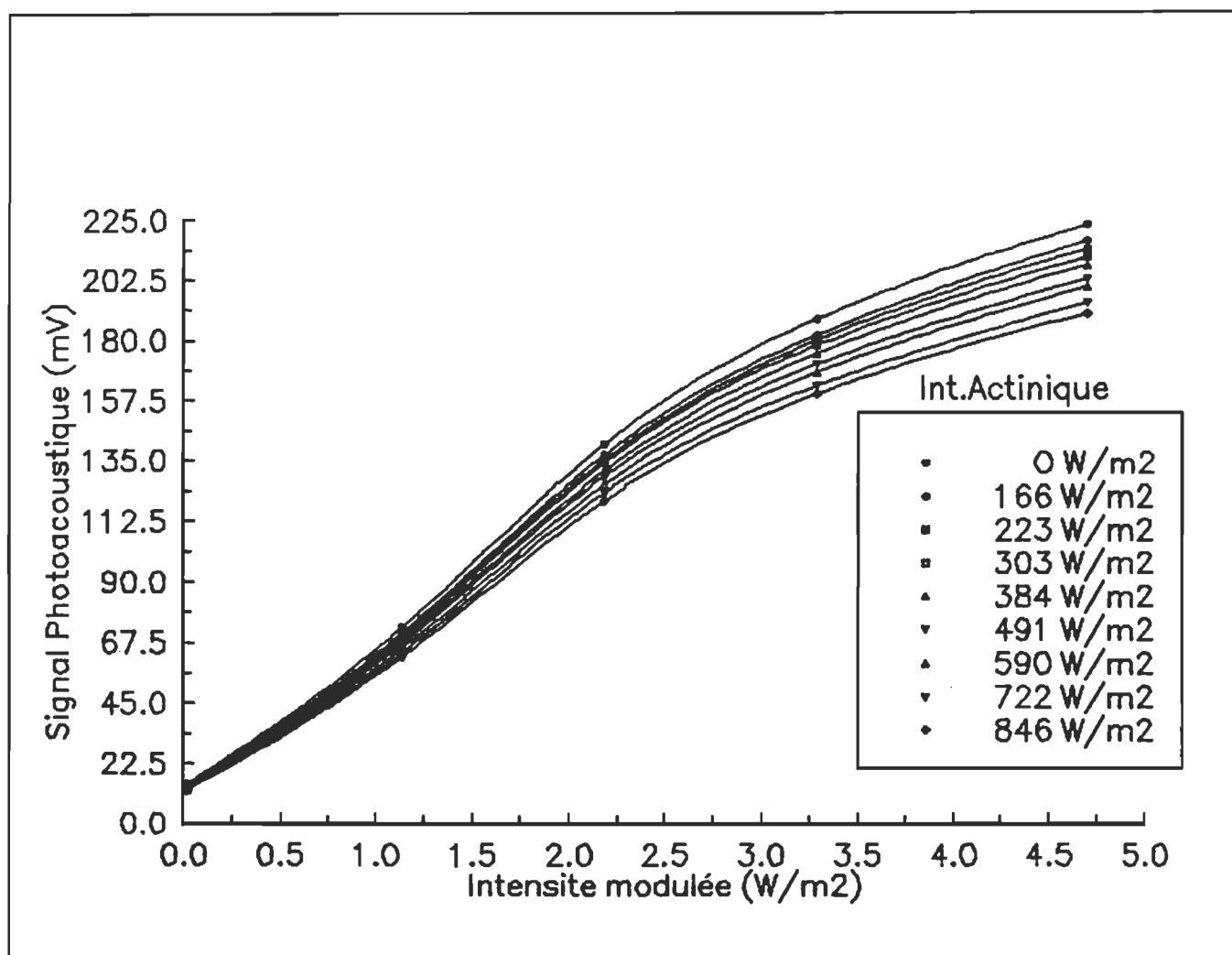


Figure 30: Effet de l'intensité du faisceau actinique sur le signal photoacoustique.

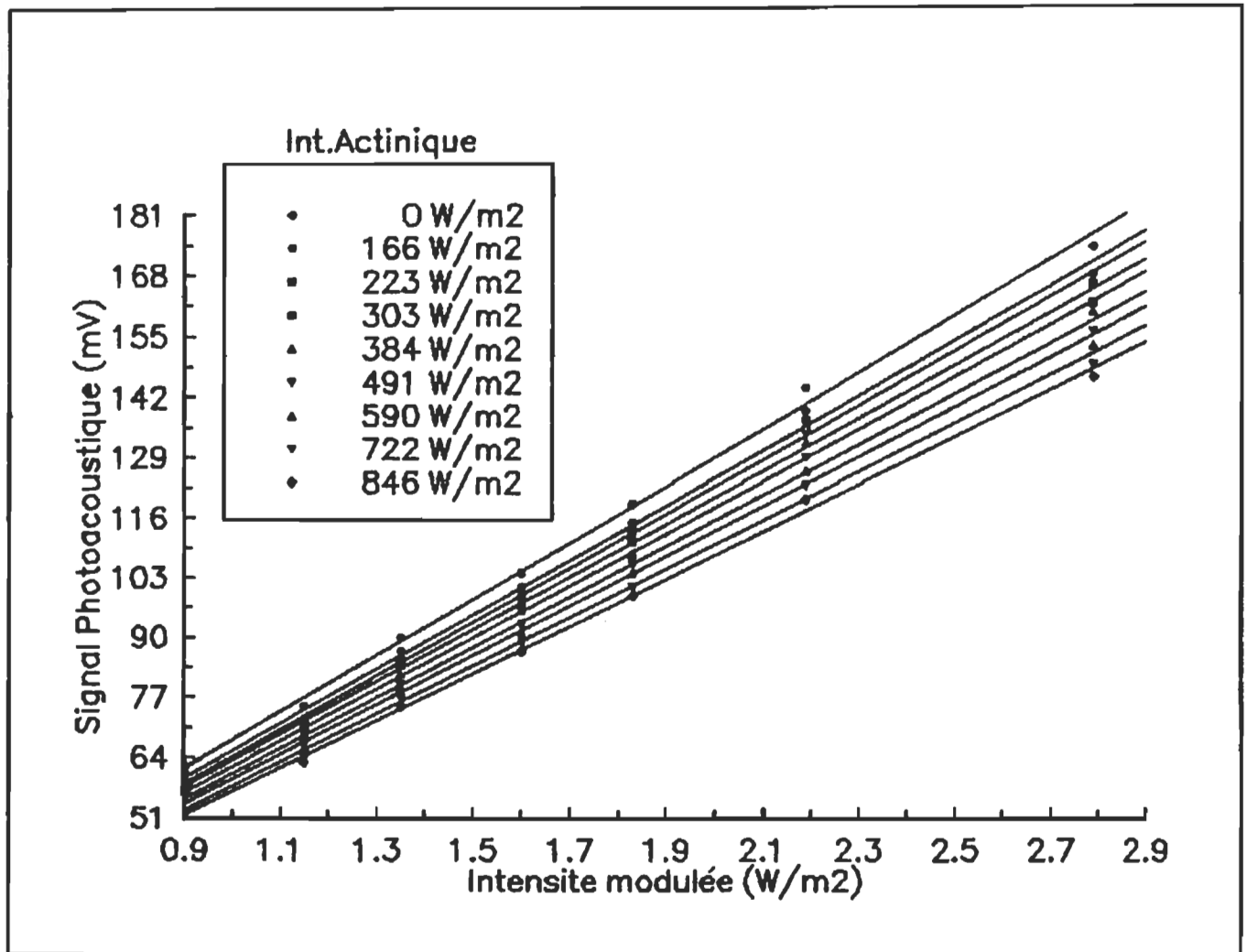


Figure 31: Effet de l'intensité du faisceau actinique sur le signal photoacoustique: partie linéaire.

Une expérience simple permet l'émission d'une hypothèse de travail. L'hypothèse est que la température de l'échantillon augmente après l'absorption de photons "actiniques". Cette expérience consistait à regarder les changements de couleurs d'un disque thermosensible en l'introduisant dans la cellule photoacoustique et par la suite en l'éclairant par le faisceau actinique. Effectivement le disque, en changeant de couleur, démontrait que suite à une absorption importante de photons, l'échantillon s'échauffait.

Pour tenir compte de la température de l'échantillon dans la théorie photoacoustique, il ne faut absolument pas rejeter le terme F_0 (équation 6 et 10) mis à part par Rosencwaig et Gersho. Si on tient compte du terme F_0 , alors l'équation 10 représente la température de l'échantillon et non la température ambiante, car

$$T_o = \beta_o + (T_e - \beta_o) \quad (22)$$

donc,

$$T_o = T_e \quad (23)$$

où T_e est la température de l'échantillon.

Le signal photoacoustique n'est plus uniquement dépendant de l'intensité de la lumière monochromatique modulée, mais aussi de la température de l'échantillon. Il est maintenant possible de modéliser le signal photoacoustique de la partie linéaire, en tenant compte de la température de l'échantillon. Alors l'équation 12 devient,

$$Q \approx \frac{D_o I_o}{T_e} \quad (24)$$

où D_o est une constante réunissant toutes les constantes de l'équation 12, sauf pour T_e qui remplace T_o (selon l'équation 23), et le terme I_o , qui est l'autre variable dans l'équation de l'amplitude du signal photoacoustique pour le noir de carbone. De plus pour faire la modélisation, la partie imaginaire du signal est rejetée.

Pour déterminer les valeurs de température correspondantes aux intensités actiniques, un prototype de cellule photoacoustique fut construit (figure 32). Cette cellule comporte, à peu de chose près, les mêmes caractéristiques que la cellule photoacoustique utilisée pour l'appareil portatif (i.e. dimensions, fenêtre), sauf que la simili-cellule ne comporte aucun microphone, mais deux trous où une sonde thermistance (résistance sensible à la température) peut être insérée. Lorsque la sonde se trouve dans l'un des trous, alors l'autre est bouché par un bouchon de Teflon. Avec ce prototype de cellule

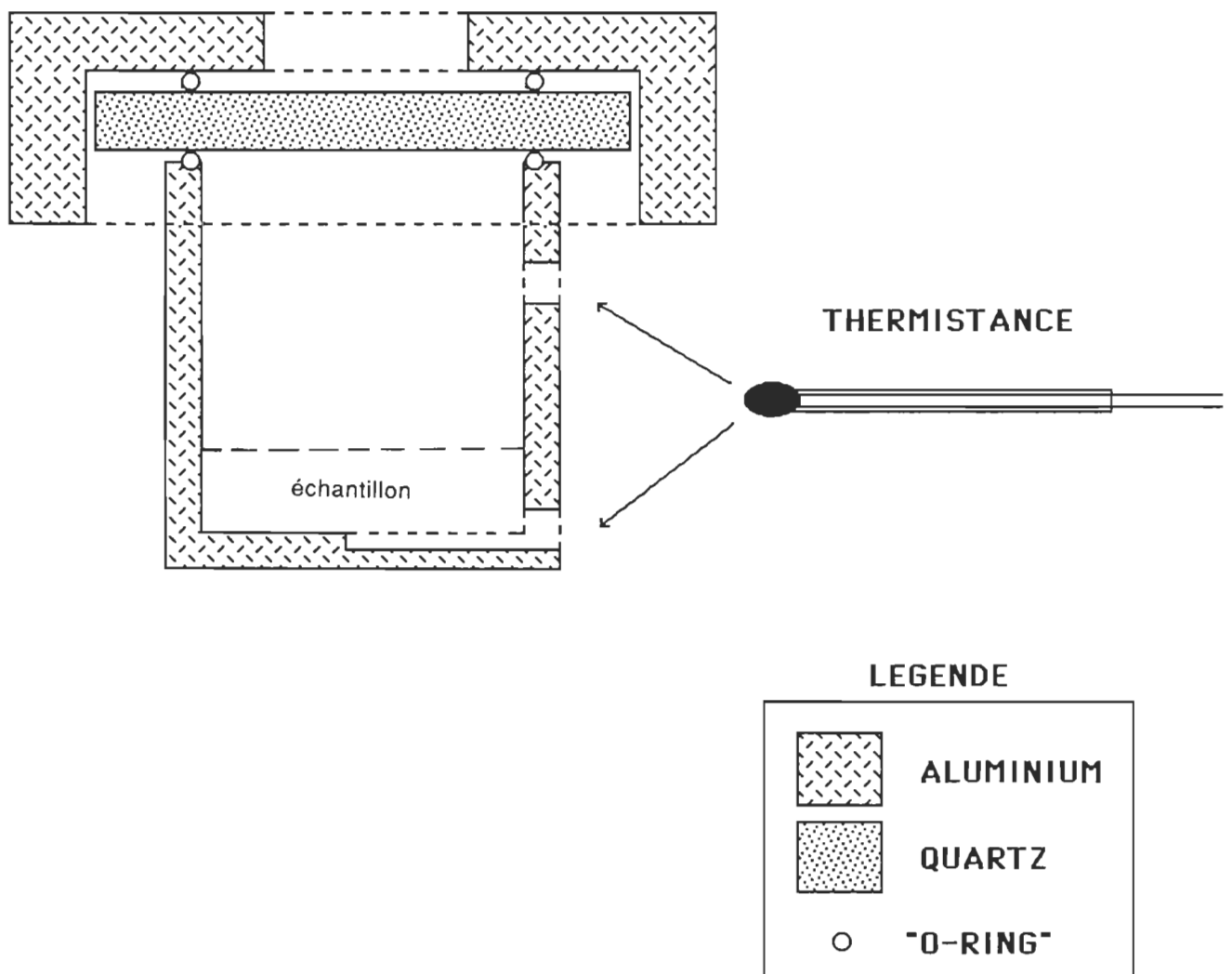


Figure 32: Prototypé de cellule photoacoustique pour la mesure de température d'échantillons.

photoacoustique, il est possible de mesurer la température de l'échantillon ou celle de la paroi de la cellule en fonction de l'intensité du faisceau actinique.

Les mesures démontrent que la température à la paroi de la cellule ne varie pas et que la température de l'échantillon augmente linéairement avec l'intensité du faisceau actinique, comme le montre la figure 33. Le modèle de l'équation 24 prévoit que si une lumière d'analyse d'intensité et de fréquence constante est utilisée, soit $2,2 \text{ W/m}^2$ et 100 Hz respectivement, on devrait observer une relation linéaire ayant une pente négative. Et le graphique de la figure 34 est le résultat de la prédiction du modèle. Ce qui veut dire que le modèle est réaliste et que l'hypothèse de départ qui stipule que l'échantillon subit une augmentation de température suite à l'absorption continue de photons est aussi valable et maintenant, renforcée. On peut aussi croire que la déviation négative de la linéarité, observée sur les figures 25, 27, et 30, est aussi la cause directe du phénomène de l'élévation de température de l'échantillon. Ceci est plausible, car après un cycle de modulation et si la quantité de photons est trop grande, il est possible que l'échantillon surchauffe et ne revienne pas à la température de départ, soit celle de la température ambiante. Donc l'hypothèse de Rosencwaig et Gersho ($F_0 = 0$) ne tient qu'aux faibles intensités du faisceau d'analyse, et surtout sans la présence d'une lumière actinique.

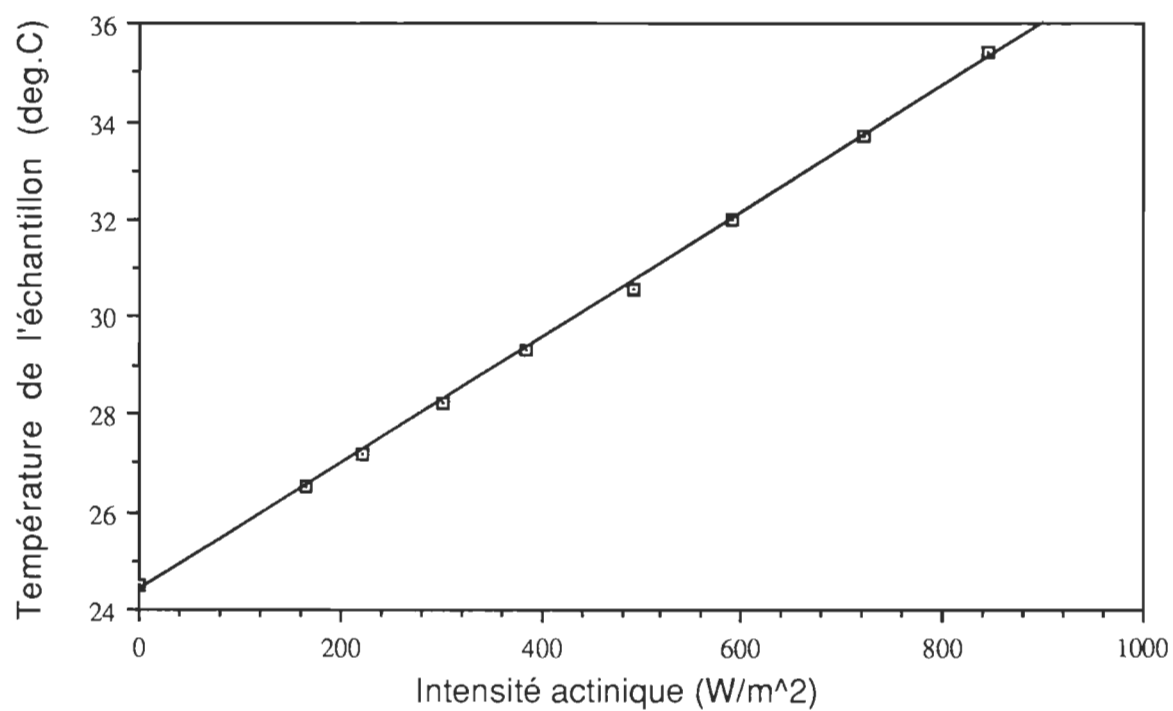


Figure 33: Variation de la température de l'échantillon en fonction de l'intensité du faisceau actinique.

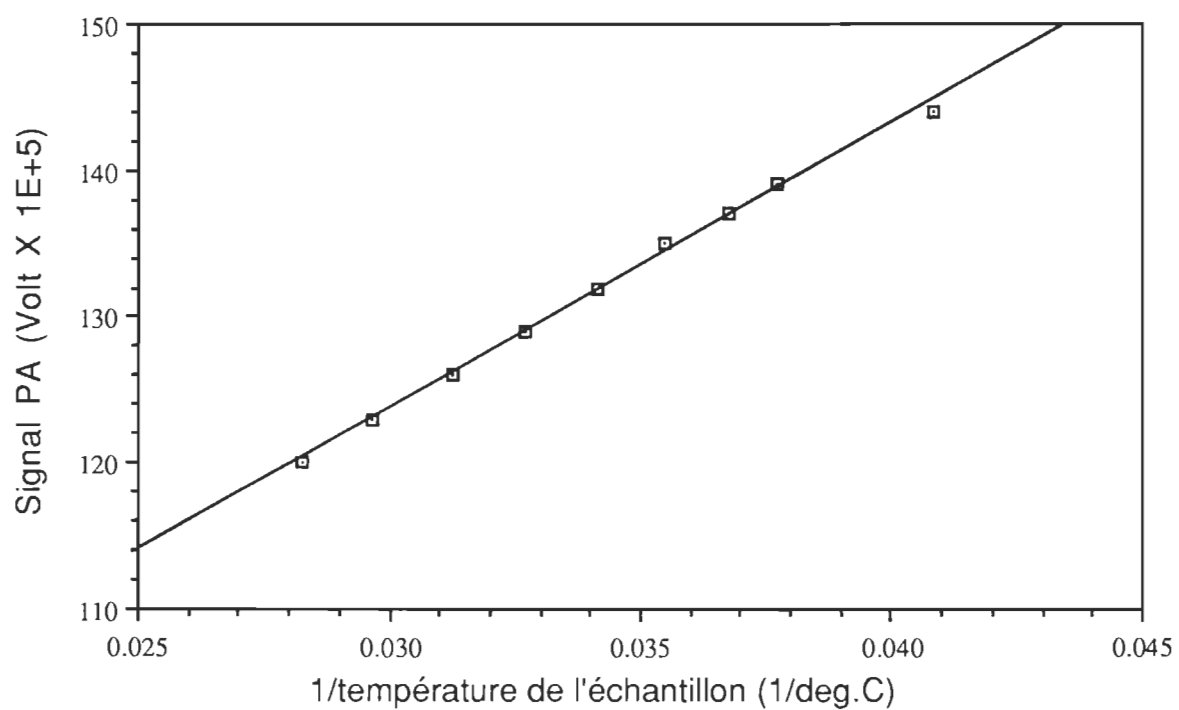


Figure 34: Variation du signal photoacoustique en fonction de la température de l'échantillon.

Par la méthode de la mesure de la température de l'échantillon, il est possible de calculer la constante D_0 de l'équation 24. Cette constante est, en fait, la valeur de la pente du graphique de la figure 35. Ce graphique est construit à partir de la valeur des différentes pentes de la figure 31, et maintenant, mise en relation avec le réciproque de la température de l'échantillon. La constante D_0 fut évaluée à environ 800. Si les mesures sont effectuées sur le noir de carbone, on peut comprendre qu'à partir des constantes incluses dans D_0 , que la valeur de la pente du graphique 35 est en fait reliée presque entièrement aux caractéristiques de la cellule photoacoustique et, en plus, au rapport des capacités calorifiques (γ) de l'échantillon. Ce qui veut dire que plus cette constante D_0 sera grande, T_e aura moins d'effet sur le signal photoacoustique, bien que l'augmentation de température sera présente. Dès lors, l'amplitude de l'effet négatif du faisceau actinique dépendra des caractéristiques de la cellule photoacoustique et de l'échantillon.

Les caractéristiques de l'échantillon auront beaucoup plus d'impact sur la constante D_0 , si l'échantillon est thermiquement épais, comme c'est le cas pour les feuilles, car dans l'équation 15, la constante D_0 contiendra beaucoup plus de constantes reliées à l'échantillon. Dans ce cas, la constante D_0 aura une autre valeur que celle trouvée avec le noir de carbone.

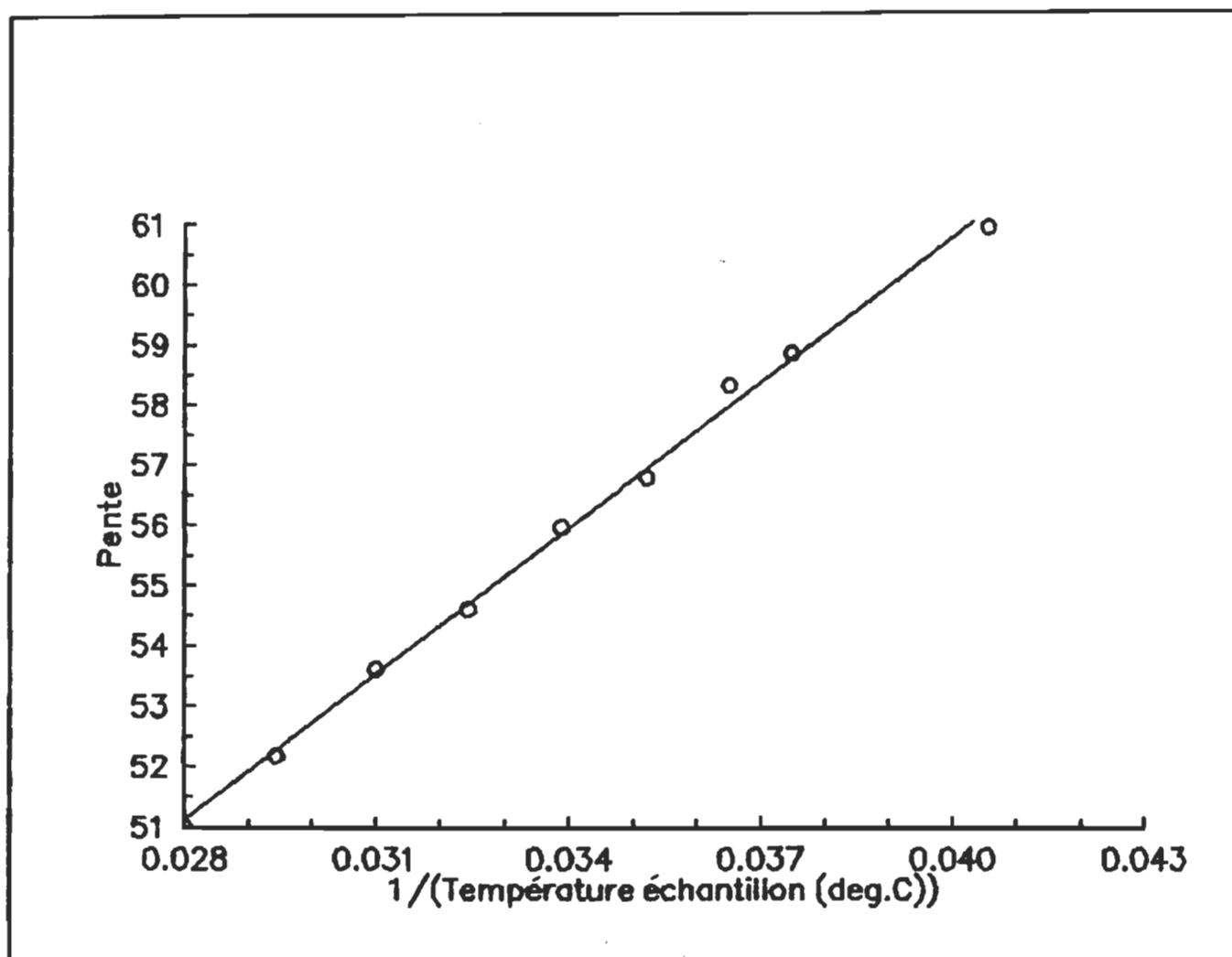


Figure 35: Relation pour le calcul de la constante D_0 à partir du graphique du signal photoacoustique en fonction de l'intensité modulée à différentes intensités de la lumière actinique.

Et tous laisse croire que D_0 , pour un échantillon photosynthétique, sera plus petit, car l'effet négatif du faisceau actinique sur le signal photoacoustique est relativement important de par la grandeur trouvée dans le tableau 10, sur l'échantillon de feuille sèche et hydratée, correspondant à une élévation de température de l'échantillon d'environ 2°C . La figure 36 fut obtenue avec une feuille de pois, à 200 Hz et sous une lumière saturante de 303 W/m^2 . Or sous ces conditions expérimentales, la quantité d'oxygène s'additionnant au signal thermique est très négligeable. Cette figure montre aussi la déviation négative du signal photoacoustique à 'hautes' intensités de la lumière modulée, comme observé avec le noir de carbone (figure 30). Mais dans le cas de l'échantillon de la feuille, la déviation commence à environ $2,5 \text{ W/m}^2$. Ceci démontre qu'une petite élévation de température induit par saturation du faisceau modulé ou par la lumière actinique, a un effet beaucoup plus important sur le signal photoacoustique provenant d'un échantillon photosynthétique que celui provenant d'un échantillon de noir de carbone. Alors la constante D_0 avec une feuille, sera plus petite que celle calculée ci-haut pour le noir de carbone.

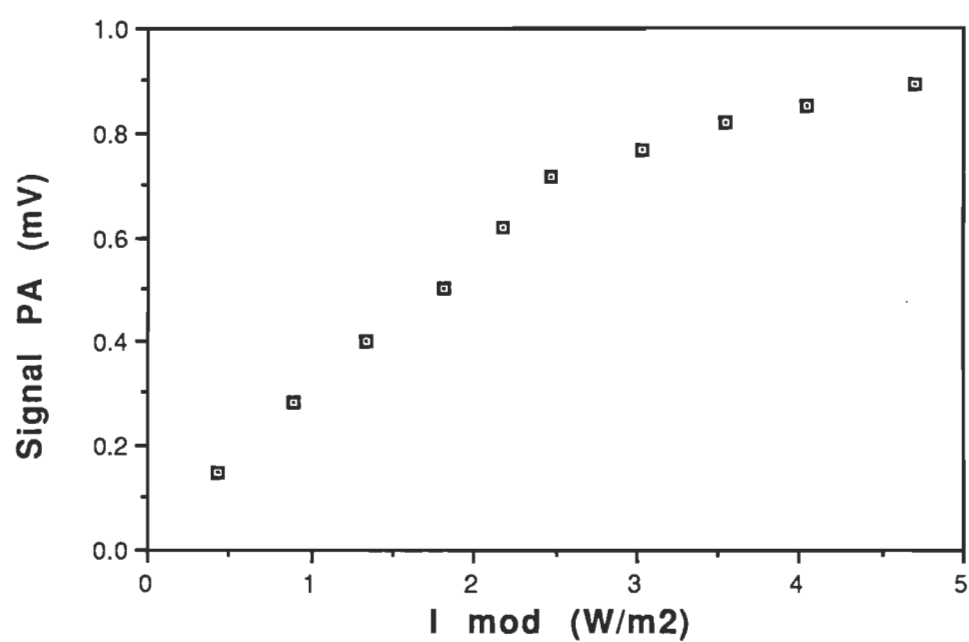


Figure 36: Effet de l'intensité du faisceau d'analyse sur le signal photoacoustique d'une feuille de pois.

2. Suggestions pour minimiser l'effet du faisceau actinique

La diminution du signal photoacoustique induite par une élévation de température suite à une grande absorption de photons peut être un outil intéressant pour déterminer les caractéristiques de la cellule photoacoustique ou de l'échantillon. Pour ce qui est des mesures chez les plantes, cet effet doit être minimisé pour que l'évaluation de l'activité photosynthétique soit possible. Bien sûr, il est impossible que le phénomène d'échauffement de l'échantillon ne se produise pas, mais il est possible de minimiser l'effet du faisceau actinique en tenant compte des deux suggestions suivantes

- 1) Il faut avoir un bon échantillon contrôle et, si possible, l'échantillon avant traitement.
- 2) De plus, il est suggéré fortement de toujours travailler en pourcent de contrôle.

La première suggestion sert surtout à soustraire l'effet du faisceau actinique, car l'effet sur le contrôle sera dans le même ordre de grandeur que sur l'échantillon traité. En autant que le traitement ne change pas les caractéristiques physiques de l'échantillon ou encore la constante D_0 . Et la seconde est pour diminuer l'effet si on change d'échantillon, ce qui change D_0 pour

chaque analyse, dans le cas où une moyenne statistique est effectuée. Mais en plus, l'effet de l'induction de la température, par rapport à la mesure de la photosynthèse, deviendra moins important si on travaille en pourcentage de contrôle.

D. Résultats préliminaires des mesures sur le terrain

Ces résultats furent obtenus sous les conditions expérimentales décrites à la section E, chapitre III.

1. Résultats de fluorescence

Dans le graphique de la figure 37, on trouve les résultats reliés à la mesure sur la courbe d'induction de la cinétique de la fluorescence de la chlorophylle. On y retrouve l'indice de la vitalité, R_{fd} , pris à 740 nm et 680 nm, ainsi que le rapport de la fluorescence stationnaire, F_{680}/F_{740} , pour les trois arbres dépéris à différents niveaux. Les résultats sont présentés sous forme de pourcent de contrôle.

Par le rapport de la fluorescence stationnaire, on en déduit que la concentration en chlorophylles est la même dans les trois arbres. Mais que la vitalité des feuilles de l'arbre dépéri à 40% est beaucoup plus grande que pour les deux autres. C'est-à-dire que le transfert d'énergie des chlorophylles aux photosystèmes

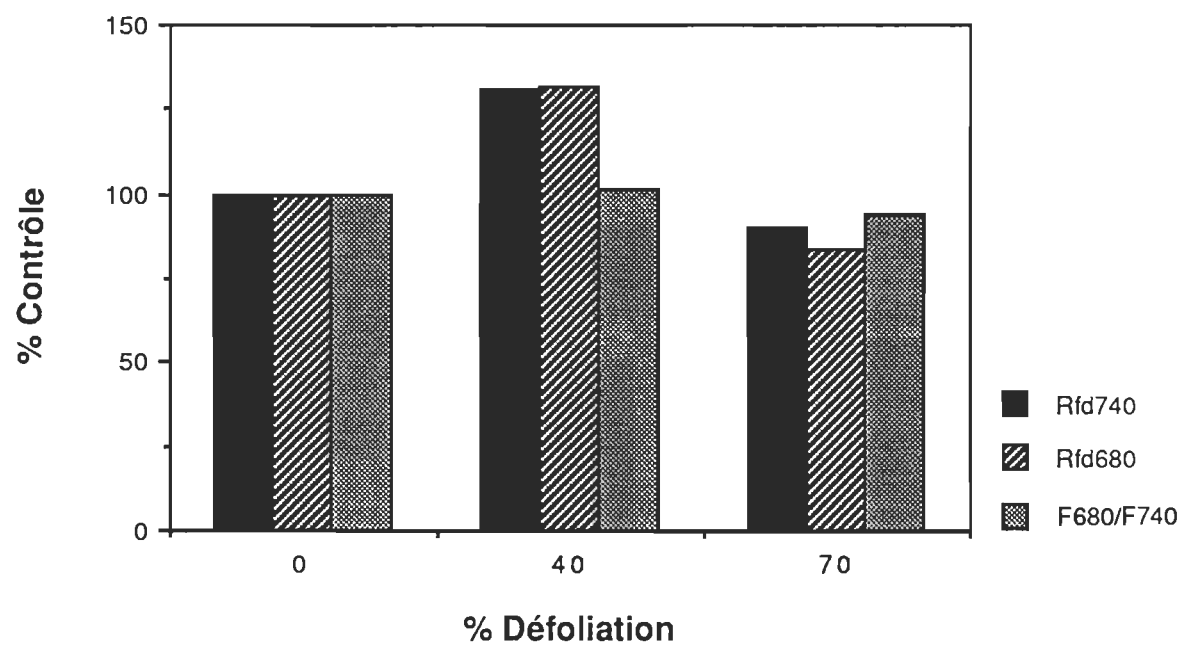


Figure 37: Mesures sur le terrain: résultats fluorimétriques.

et possiblement le rendement de séparation de charges et l'efficacité du transport d'électron se fait plus efficacement dans le cas de l'arbre dépéri à 40%. L'arbre dépéri à 70% montre une activité légèrement inférieure à notre témoin (0% de défoliation).

2. Résultats de photoacoustique.

Sur la figure 38 sont présentés les résultats des mesures photoacoustiques faites sur les trois arbres dépéris. Les résultats sont aussi exprimés en pourcent de contrôle. On y retrouve; le vecteur d'oxygène, Ao_2 ; le vecteur thermique, Apt ; la quantité Ao_2 normalisée au signal thermique, Ao_2/Apt ; et la grandeur du stockage d'énergie photosynthétique, S.E.P..

De par les observations photoacoustiques, le vecteur oxygène et le vecteur thermique suivent une tendance proportionnelle au degré de dépérissement. Cependant, pour la quantité Ao_2 normalisée au signal thermique, la tendance est très faible. Par contre, le stockage d'énergie photosynthétique semble être inversement proportionnel aux résultats trouvés par l'indice de vitalité avec la fluorescence de la chlorophylle. Cependant aucune conclusion ne peut vraiment être portée sur ce point, car il faut se rappeler que ces résultats sont préliminaires, que les intensités du faisceau actinique ne pouvaient être changées (étant toujours au maximum de 846 W/m^2), et que les arbres

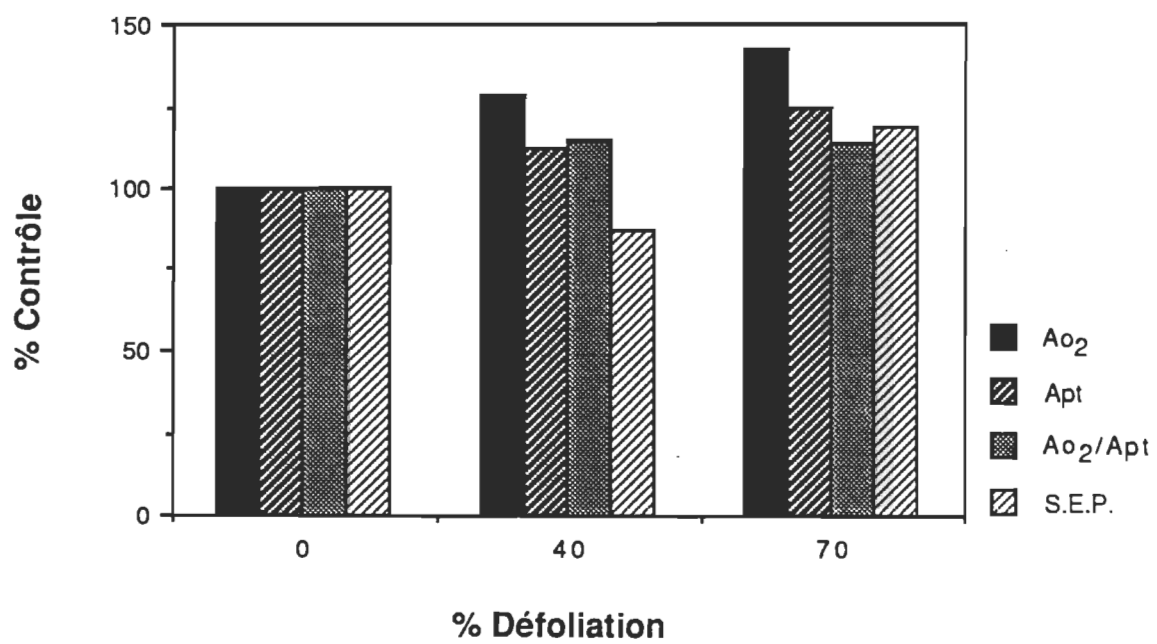


Figure 38: Mesures sur le terrain: résultats photoacoustiques.

analysés étaient en état de sénescence avancé.

3. Comparaison entre l'examen visuel et les mesures expérimentales

Ce qui suit est la description visuelle des trois arbres telle que notée dans le cahier de laboratoire le 27 septembre 1990.

"..... #63: Des trois, c'est l'arbre le plus fourni et le plus haut. Malgré qu'il soit l'arbre le plus sain, il a les feuilles plus jaunes que les deux autres arbres.

#55: L'examen visuel ne montre pas un très grand dépérissement, mais il y a, par contre, certaines branches où il n'y a pas de feuilles. En comparant les trois arbres, cet arbre a les feuilles moyennement jaunes mais, tout de même, plus vertes que l'arbre #63. Il est aussi de la même taille que l'arbre #67. De plus, il est le seul à ne pas être sur un système de récupération de sève.

#67: Il est facile à voir que cet arbre est malade. Toutes ses feuilles se situent sur les branches inférieures de l'arbre, aucune feuille dans la cime. Mais les feuilles sont plus vertes que chez les deux autres arbres analysés....."

L'examen visuel des trois arbres mis en relation avec les mesures fluorimétriques et photoacoustiques démontre que les mesures photoacoustiques sembleraient suivre les données oculaires. Cependant, la relation qui existe entre les résultats de photoacoustique, de fluorescence, et visuels, n'est pas encore connue. Ces résultats étant préliminaires, ils ne peuvent être employés pour tirer des conclusions sur la vitalité des trois arbres, mais ils peuvent être utilisés pour démontrer que l'appareil fonctionne très bien sur le terrain, et qu'il peut mesurer une activité photosynthétique. Ceci veut dire que les mesures *in situ* sont possibles.

4. Mesures supplémentaires

Des mesures récentes ont été effectuées. La prise de données fut faite dans la semaine du 22 au 26 Juillet 1991 au même site et sur les mêmes arbres décrits à la section E, chapitre III. En cette période de l'année, le rendement photosynthétique est à son maximum, et ainsi la mesure de la photosynthèse se fera dans des conditions optimums.

Les conditions expérimentales pour les mesures de la fluorescence sont les mêmes que celles de la sous-section 1, section E, chapitre III. Mais pour ce qui est des mesures photoacoustiques, elles furent obtenues après un temps d'incubation de 3 minutes dans la cellule photoacoustique et sous le faisceau

modulé. Les fréquences de modulation sélectionnées étaient 40 Hz et 250 Hz. Pour chaque fréquence, une moyenne sur 200 points, à 5 points par seconde, est retenue. Le temps de stabilisation avant la prise de données pour chaque fréquence était de 30 secondes.

L'intensité de la lumière modulée était de $4,04 \text{ W/m}^2$ et celle du faisceau actinique, maintenant variable, était réglée à 303 W/m^2 . La constante de temps sur l'amplificateur à verrouillage de phase était de une seconde, et le facteur de multiplication sur l'unité d'amplification de la cellule photoacoustique était de 64.

Pour chaque arbre, 20 échantillons furent analysés par photoacoustique et 20 autres par la technique fluorimétrique. Les feuilles furent coupées dans la même partie de l'arbre, soit environ au sud et dans la partie inférieure de la zone foliaire. Chaque disque de feuille fut pris dans la même région de la feuille. L'analyse des trois types de feuilles était faite en alternance, soit celui à 0%, 40% et 70% de défoliation.

Le graphique de la figure 39 montre les résultats fluorimétriques pour les trois arbres analysés. Ces résultats sont présentés en pourcentage de contrôle, l'arbre contrôle est celui n'étant pas dépéri (i.e. 0% de défoliation). Bien que les indices de vitalité (Rfd680 et Rfd740) diminuent en fonction du

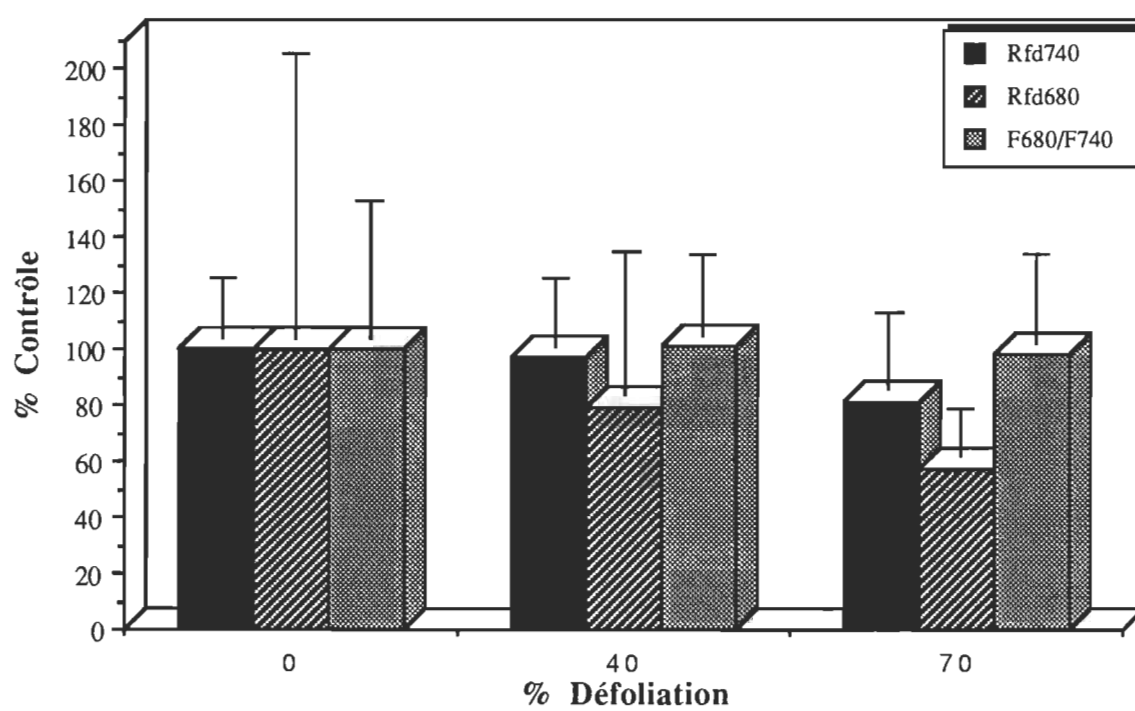


Figure 39: Mesures supplémentaires sur le terrain: résultats fluorimétriques.

pourcentage de défoliation, ces différences ne sont cependant pas statistiquement différentes. Le rapport F680/F740 démontre que les trois types de feuille ont la même densité chlorophyllienne.

Pour ce qui est de la figure 40, le graphique résume les données photoacoustiques. Les résultats sont aussi exprimés en terme de pourcentage de contrôle relatif à l'arbre sain. Bien que la valeur du stockage d'énergie photosynthétique (S.E.P.) a une tendance à la baisse et que la valeur de Apt tend à augmenter avec le pourcentage de défoliation, ces résultats ne sont pas statistiquement différents. Il est aussi évident que les valeurs pour Ao_2 et Ao_2/Apt ne varient pas avec l'état de la défoliation.

De plus, pour bien comprendre les résultats, il faut avoir une idée de l'environnement de l'arbre et des feuilles échantillonnées. L'arbre témoin est le plus grand et le plus gros des trois. La majeure partie du feuillage reçoit directement la lumière du soleil car la population d'arbre autour de cet arbre est faible. L'arbre dépérit à 40% a un environnement plus dense, et la majeure partie du feuillage inférieur est protégé de la lumière directe provenant du soleil. Dans le cas de l'arbre ayant une défoliation de 70%, l'environnement est encore plus marqué. Le feuillage se situe dans le bas de l'arbre, à environ huit à dix pieds du sol. Et la densité d'arbre autour est plus grande que dans les deux autres cas, donc le feuillage de l'arbre ayant 70%

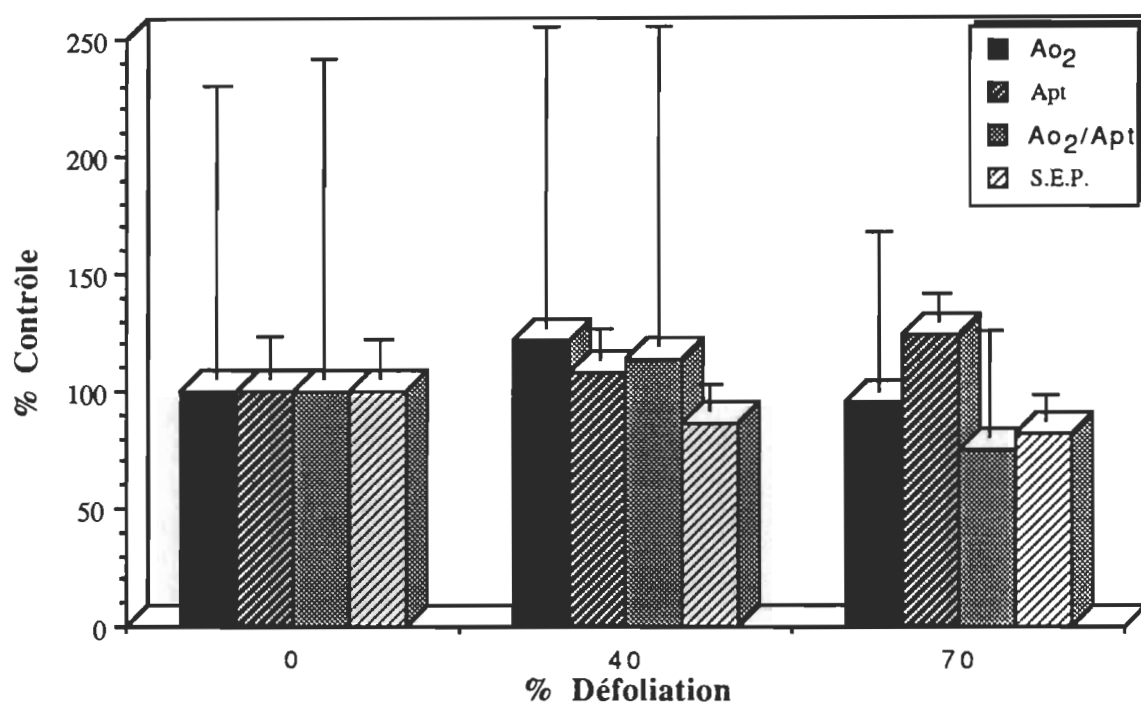


Figure 40: Mesures supplémentaires sur le terrain: résultats photoacoustiques.

de défoliation est toujours dans l'ombre de la forêt. Ceci fait en sorte que les feuilles de cet arbre étaient plus larges que les feuilles des deux autres arbres. De plus, la cime de cet arbre est totalement sèche.

Basé sur le type des mesures et du site d'échantillonnage, on ne peut expliquer à l'échelle moléculaire les tendances des résultats, cependant on peut les expliquer morphologiquement. On sait que la stoechiométrie en photosystème II, photosystème I, et en complexe antenne varie selon la qualité de la lumière reçue par la plante (60). La population en photosystème II sera plus grande si la proportion de lumière rouge augmente. Dans le cas des trois arbres étudiés, la qualité ainsi que la quantité de lumière est différente. La population en complexe du dégagement d'oxygène sera forcément différente d'un arbre à l'autre, mais aussi d'un échantillon à l'autre. Et malgré cela, la quantité d'oxygène émise est la même pour les trois arbres étudiés. De plus, on sait que la dynamique du signal d'oxygène est complexe et elle est constituée des trois vecteurs suivants: i) le dégagement photochimique d'oxygène; ii) l'absorption photochimique d'oxygène; et iii) l'absorption non-photochimique d'oxygène. Ce dernier facteur est relié à la respiration nocturne. On sait, selon la présente étude, que le signal d'oxygène ne varie pas et que l'activité photochimique tend à diminuer en fonction du degré de défoliation, c'est-à-dire que le S.E.P. diminue ainsi que la valeur Rfd. Comme la grandeur du stockage d'énergie photo-

chimique trouvée par la photoacoustique et celle de l'activité photosynthétique mesurée par fluorimétrie diminuerait, le dégagement photochimique d'oxygène diminuerait. Donc, il faut que l'absorption non-photochimique ainsi que l'absorption photochimique d'oxygène diminuent pour compenser la grandeur du vecteur oxygène. La mesure de l'absorption photochimique et non-photochimique devrait alors montrer des différences pour les trois arbres. Cependant, la mesure de la consommation totale d'oxygène est difficile à réaliser.

Mais les mesures photoacoustiques et de la fluorescence, malgré les tendances, ne montrent aucune différence statistique dans l'activité photosynthétique des trois arbres. Il n'y a aucune corrélation entre le degré de défoliation et l'activité des feuilles. Et les tendances refléteraient plus l'état du feuillage dû à l'environnement immédiat de l'arbre.

L'activité des feuilles étant semblable pour les trois arbres, ceci montre que l'activité photosynthétique ne serait pas affectée par le dépérissement, et donc que l'effet du dépérissement se situerait surtout au niveau du tronc et des branches. Les feuilles n'ont aucune raison de plus travailler pour la partie morte de la plante et ne travaillent que pour la partie vivante. Dans le cas des arbres fortement dépéris, la sénescence est précoce. Et il est raisonnable de penser que si les branches et le tronc sont affectés, l'apport en minéraux et en éléments nutri-

tifs sera moindre, et ainsi les feuilles iront en état de sénescence plus rapidement.

Si ces mesures reflètent vraiment la réalité, alors les polluants atmosphériques auraient le même effet sur toutes les feuilles, peu importe le degré de dépérissement de l'arbre. Cette hypothèse est raisonnable, car les feuilles tombant à chaque année, elles ne conservent pas les stress des années précédentes. La machine photosynthétique doit être complète, sinon la feuille ne fonctionnerait pas et mourrait. Si les feuilles sont toutes intègres, alors les polluants auront le même effet sur toutes les feuilles. Seule une pollution régionale de la plante, par rapport à un témoin, montrera une différence dans l'activité photosynthétique.

CONCLUSION

Le but premier du travail effectué dans le cadre de cette maîtrise en biophysique était de construire un appareil combinant les techniques de la photoacoustique et de la fluorimétrie dans un montage portatif, dont le contrôle se ferait entièrement par ordinateur. L'appareil fut complété selon la demande. Mais en plus, les performances de l'appareil portatif dépassent, et de loin, nos espérances. Par exemple, le rapport signal/bruit mesuré est très grand, ce qui démontre la grande sensibilité du montage pour les mesures photoacoustiques. L'expérience avec le DCMU prouve bien que le photomètre portatif peut mesurer l'activité photosynthétique. Mais de plus, la grande sensibilité de l'appareil pourrait servir pour la mesure du transport cyclique d'électrons par le photosystème I.

Une mise en garde s'impose concernant la portabilité d'un système incluant des mesures photoacoustiques. Pour mesurer le dégagement d'oxygène par photoacoustique, il faut absolument que la détection, dans la cellule photoacoustique, soit faite avec un microphone. Par le principe des microphones, la moindre vibration aléatoire de la membrane donne un signal qui fait partie du bruit. Donc il faut que la cellule photoacoustique soit installée sur une base absorbant les vibrations du milieu ambiant. Il est donc impossible, avec un microphone comme détecteur, de penser à la construction d'un système qui serait du type 'sac-à-dos'. Mais le fait de pouvoir

transporter facilement un appareil de photoacoustique sur un site ou un autre mérite le qualificatif de portatif.

Tel qu'expliqué dans la section A, chapitre III, l'appareil portatif est le seul à utiliser une onde sinusoïdale pour la modulation de la lumière intermittente. Ainsi, il est le seul à vraiment suivre la théorie photoacoustique de Rosencwaig et Gersho. Concernant la forme de la modulation, on a vu qu'elle n'affecte pas l'exposant de la fréquence angulaire trouvé dans l'équation pour la quantification du signal photoacoustique (équation 12 et 15 pour les deux cas spéciaux étudiés). L'exposant de la fréquence angulaire n'est que la conséquence de manipulations mathématiques, et non celle de mesures expérimentales. Mais la forme de la modulation du faisceau d'analyse a un effet direct sur l'amplitude du signal photoacoustique. Le signal photoacoustique est directement proportionnel à l'aire sous la courbe de la forme de la modulation pour un I_0 donné, c'est-à-dire à la quantité de photons arrivant à l'échantillon, d'où l'importance d'utiliser des unités en W/m^2 pour décrire l'intensité du faisceau modulé. On a aussi démontré que le signal thermique et d'oxygène sera aussi dépendant de la forme de la modulation. De plus, il serait important de corriger le signal photoacoustique avec l'intensité de la lumière modulée ou avec le délai du signal.

L'introduction d'une lumière blanche non-modulée et de forte intensité pour saturer les processus photosynthétiques, oblige à être très prudent concernant l'interprétation du signal photoacoustique non

seulement dans l'utilisation d'un faisceau actinique, mais aussi pour les études où l'intensité de la lumière modulée est la variable indépendante. Il est clair que la lumière saturante, et aussi les 'hautes' intensités du faisceau d'analyse, introduisent une élévation de température de l'échantillon se traduisant par une diminution du signal photoacoustique. Ce phénomène est facilement explicable par la théorie RG, mais de plus il fut trouvé que l'hypothèse $F_0 = 0$, selon Rosencwaig et Gersho, n'est valide qu'aux faibles intensités modulées. Cependant, l'expression de la température, pour toute la courbe du graphique du signal photoacoustique en fonction de l'intensité modulée (figure 30), sera plus complexe que l'expression décrite dans la théorie RG. L'expression de la température devra tenir compte de I_0 .

La méthode du changement du signal photoacoustique en fonction de la température de l'échantillon (sous l'action du faisceau actinique) est pratique pour déterminer la constante D_0 du système de mesure tel que déterminée avec le noir de carbone. Cette constante D_0 est représentative du système, et sera inversement proportionnelle à la sensibilité de l'instrument de mesure. Quant aux constantes regroupées dans D_0 , elles sont indépendantes de la température de l'échantillon, car le graphique de la figure 35 montre une droite possédant un coefficient de corrélation élevé (i.e. 0,997).

Il fut aussi démontré, par les mesures sur le terrain, que le photomètre portatif de photoacoustique et de fluorescence, surnommé le "DOOZER" (suite aux personnages du même nom créés par Jim

Henson), fonctionne aussi bien à l'intérieur que sur un site expérimental extérieur. Ces mesures semblent démontrer qu'il n'y a pas de corrélation entre le degré de dépérissement de l'arbre et l'activité photosynthétique des feuilles. Pour un site donné, il n'y aurait pas de différence dans la photosynthèse d'un arbre sain et d'un autre très malade. Donc la pollution atmosphérique affectant directement les feuilles aurait le même effet peu importe le degré de dépérissement. Pour un site donné, la photosynthèse serait beaucoup plus affectée par l'environnement immédiat de la plante.

Cependant, il serait sûrement possible de voir une différence entre deux sites d'échantillonnage, si la quantité de polluant est différente d'un site à l'autre. Suivant cette pensée, imaginons une expérience consistant à évaluer l'impact de la pollution sur la végétation autour d'une usine. Pour une telle étude, trois essences de plantes différentes seraient suivies. Ou encore, une essence préselectionnée sera semée sur le site. Et la mesure de la photosynthèse par spectroscopie photoacoustique et fluorimétrique serait faite en fonction de la distance de la source de pollution (si pollution il y a).

Ainsi une carte bi-dimensionnelle de l'impact autour de l'usine sera trouvée. Les résultats dépendront beaucoup de la direction des vents. Ce type d'étude serait saisonnière, car les plantes se renouvellent à chaque année. Par exemple, les compagnies ABI et Norsk-Hydro de Bécancour (Québec, Canada) étudient l'impact de leurs

rejets sur l'environnement. Il serait intéressant de mesurer l'impact des rejets sur la végétation environnante avec l'aide de l'appareil décrit dans ce mémoire.

Mais une étude à long terme sur le terrain demandera plusieurs personnes pour prendre la relève régulièrement, soit à toutes les semaines. Il serait préférable que chaque équipe soit constituée de deux personnes partageant les joies et les problèmes reliés aux mesures sur le terrain.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Koziol, M. J., Whatley, F. R. Gaseous air pollutants and plant metabolism. Toronto: Butterworths, 1984.
- 2 Marx, J. L. Air pollution: effects on plants, Science, 1975, 187, 731-733.
- 3 Darrall, N.M. The effect of air pollutant on physiological processes in plants, Plant, Cell and Environm., 1989, 12, 1-30.
- 4 Anon Manual on methodologies and criteria for harmonized sampling assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests. Convention on Long Range Transboundary Air Pollution, International Cooperative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests. UNECE: Geneva, 1987.
- 5 Megasi, L. P. Acid rain national early warning system. Manual on plot establishment and monitoring Canadian Forestry Service, Forest Science Directorate, Information Report DPC-X-25. Ottawa: Canadian Forestry Service, 1988.

- 6 Bults, G., Horwitz, B. A., Malkin, S., Cahen, D. Photoacoustic measurements of photosynthetic activities in whole leaves. Photochemistry and gas exchange, Biochim. Biophys. Acta, 1982, 679, 452-465.
- 7 Garrec, J.-P. Mesures biophysiques de la vigueur des arbres, Proceedings of the International Union of Forest Research Organizations, 19th World Congress 5-11, August 1990, Montréal, Canada, 2, 68-77.
- 8 Delieu, T., Walker, D. A. An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts, New Phytol., 1972, 71, 201-225.
- 9 Walker, D. A. Automated measurement of leaf photosynthetic oxygen evolution as a function of photon flux density, Philos. Trans. R. Soc. London, B, 1989, 323, 313-326.
- 10 Tchan, Y. T., Chiou, A. C. M., New, P. B., Funnel, G. R. The photobioluminometer, an instrument for the study of ecological factors affecting photosynthesis, Microb. Ecol., 1977, 3, 327-332.
- 11 Denny, P., Orr, P., Erskine, D. J. C. Potentiometric measurements of carbon dioxide flux of submerged aquatic macrophytes in pH-stated natural waters, Freshwater Biol., 1983, 13, 507-519.

- 12 Calvin, M. The path of carbon in photosynthesis, Science, 1962, 135, 879-889.
- 13 Calvin, M. Forty years of photosynthesis and related activities, Photosynth. Res., 1989, 21, 3-16.
- 14 Storey, R. D. Textbook errors & misconceptions in biology: Photosynthesis, The Am. Biol. Teach., 1989, 51, 271-274.
- 15 Leuning, R., Sands, P. Theory and practice of a portable photosynthesis instrument, Plant. Cell and Environm., 1989, 12, 669-678.
- 16 McPherson, H. G., Green, A. E., Rollinson, P. L. The measurement, within seconds, of apparent photosynthetic rates using a portable instrument, Photosynthetica, 1983, 17, 395-406.
- 17 Ireland, C. R., Long, S. P., Baker, N. R. An integrated portable apparatus for the simultaneous field measurement of photosynthetic CO₂ and water vapour exchange, light absorption and chlorophyll fluorescence emission of attached leaves, Plant. Cell and Environm., 1989, 12, 947-958.
- 18 Geiger, D. R., Fondy, B. R. A method for continuous measurement of export from a leaf, Plant Physiol., 1979, 64, 361-365.

- 19 Michael, D. A., Dickmann, D. I., Gottschalk, K. W., Nelson, N. D., Isebrands, J. G. Determining photosynthesis of tree leaves in the field using a portable $^{14}\text{CO}_2$ apparatus: Procedures and problems, Photosynthetica, 1985, 19, 98-108.
- 20 Naylor, D. G., Teare, I. D. An improved, rapid, field method to measure photosynthesis with $^{14}\text{CO}_2$, Agron. J., 1975, 67, 404-406.
- 21 Bingham, G. E., Coyne, P. I. A portable temperature - controlled, steady-state porometer for field measurements of transpiration and photosynthesis, Photosynthetica, 1977, 11, 148-160.
- 22 Caporn, S. J. M., Wood, W. A. A controlled-environment chamber for measurement of canopy photosynthesis by small stands of lettuce (*Lactuca sativa* L.), Plant, Cell and Environm., 1990, 13, 489-493.
- 23 Field, C., Berry, J. A., Mooney, H. A. A portable system for measuring carbon dioxide and water vapor exchange of leaves, Plant, Cell and Environm., 1982, 5, 179-186.
- 24 Küppers, M., Swan, A. G., Tompkins, D., Gabriel, W. C. L., Küppers, B. I. L., Linder, S. A field portable system for the measurement of gas exchange of leaves under natural and controlled

- conditions: examples with field-grown *Eucalyptus pauciflora* Sieb. ex Spreng. ssp. *pauciflora*, *E. behriana* F. Muell. and *Pinus radiata* R. Don., Plant. Cell and Environm., 1987, 10, 425-435.
- 25 Woodward, F. I. Instruments for the measurement of photosynthetically active radiation and red, far-red and blue light, J. Appl. Ecol., 1983, 20, 103-115.
- 26 Bradburne, J. A., Kasperbauer, M. J., Mathis, J. N. Reflected far-red light effects on chlorophyll and light-harvesting chlorophyll protein (LHC-II) contents under field conditions, Plant Physiol., 1989, 91, 800-803.
- 27 Daoust, G., Ansseau, C., Granderg, H. B., vanHulst, R. Réflectance spectrale de feuille d'érable à sucre (*Acer saccharum*) souffrant de dépérissement, Colloque sur "Le dépérissement des érablières, cause et solutions possibles", Université Laval, 14 au 17 mai 1990, 71-80.
- 28 Idle, D. B., Proctor, C. W. An integrating sphere leaf chamber, Plant. Cell and Environm., 1983, 6, 437-439.
- 29 Weber, J. A., Jurik, T. W., Tenhunen, J. D., Gates, D. M. Analysis of gas exchange in seedlings of *Acer saccharum*: integration of field and laboratory studies, Oecologia, 1985, 65, 338-347.

- 30 Hardacre, A. K., Nicholson, H. F., Boyce, M. L. P. A portable photometer for measurement of chlorophyll in intact leaves, N. Z. J. of Exp. Agric., 1984, 12, 357-362.
- 31 Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C., Rinderle, U., Schmuck, G. Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology, Radiat. Environ. Biophys., 1986, 25, 297-308.
- 32 Lichtenthaler, H. K., Rinderle, U. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants, CRC Crit. Rev. Anal. Chem., 1988, 19(sup.1), S29-S85.
- 33 Bolhàr-Nordenkamp, H. R., Long, S. P., Baker, N. R., Öquist, G., Schreiber, U., Lechner, E. G. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of the current instrumentation, Fonctionnal Ecol., 1989, 3, 497-514.
- 34 Chappelle, E. W., Williams, D. L., Nelson, R. F., McMurtrey III, J. E. Lasers may help in remote assessment of vegetation, Laser Focus World, 1989, June, 123-132.
- 35 Bults, G., Nordal, P.E., Kanstad, S. O. In vivo studies of gross photosynthesis in attached leaves by means of photothermal radiometry, Biochim. Biophys. Acta, 1982, 682, 234-237.

- 36 DePaula, M. H., Carvalho, M. A., Alves, L. M., Aegerter, M. A. An open-ended photothermal cell for *in vivo* measurements, J. Appl. Phys., 1987, 61, 2617-2620.
- 37 Rosencwaig, A. Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy, Toronto: John Wiley & Sons, 1980.
- 38 Dogigli, H. La Magie des Rayons, Paris: Maison de la Bonne Presse, 1958.
- 39 Bernard, R. La Luminescence, Paris: Presses Universitaires de France, 1961.
- 40 Dérivé, M. Les Applications Pratiques de la Luminescence, Paris: Dunod, 1955.
- 41 Schreiber, U. Chlorophyll fluorescence yield changes as a tool in plant physiology I. The measuring system, Photosynthesis Res., 1983, 4, 361-373.
- 42 Lichtenthaler, H. K. Applications of chlorophyll fluorescence in stress physiology and remote sensing, dans: Applications of Remote Sensing in Agriculture (M. Steven et J. A. Clark, eds.), Londres: Butterworths Scientific Ltd., 1990.

- 43 Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorimeter, Photosynthesis Res., 1986, 10, 51-62.
- 44 Rock, B. N., Hoshizaki, T., Lichtenthaler, H. K., Schmuck, G. Comparison of in situ measurements of forest decline symptoms in Vermont, (USA) and the Schwarzwald (FRG), dans: Proc. Intnatl Geosci. and Remote Sensing Symp., Zurich: Vol III. ESA Scientific and Technical Publications Branch, Noordwijk, 1986.
- 45 Bell, A. G. On the production and reproduction of sound by light, Am. Jour. Sci. Third Series, 1880, 20, 305-324.
- 46 Bell, A. G. Upon the production of sound by radiant energy, Phil. Mag., 1881, 11, 510-528.
- 47 McDonald, F. A., Wetsel Jr, G. C. Generalized theory of the photoacoustic effect, J. Appl. Phys., 1978, 49, 2313-2322.
- 48 Poulet, P., Chambron, J., Unterreiner, R. Quantitative photoacoustic spectroscopy applied to thermally thick samples, J. Appl. Phys., 1980, 51, 1738-1742.

- 49 Lasser-Ross, N., Malkin, S., Cahen, D. Photoacoustic detection of photosynthetic activities in isolated broken chloroplasts, Biochim. Biophys. Acta, 1980, 593, 330-341.
- 50 Poulet, P., Cahen, D., Malkin, S. Photoacoustic detection of photosynthetic oxygen evolution from leaves. Quantitative analysis by phase and amplitude measurements, Biochim. Biophys. Acta, 1983, 724, 433-446.
- 51 Buschmann, C., Prehn, H., Lichtenthaler, H. Photoacoustic spectroscopy (PAS) and its application in photosynthesis research, Photosynthesis Res., 1984, 5, 29-46.
- 52 N'soukpoé-Kossi, C. N., Bélanger, R., Keilani, S., Proteau, H., Boivin, P., Leblanc, R. M. Short-term acid damage to photosynthesis in corn and sugar maple leaves assessed by photoacoustic spectroscopy, Can. J. Bot., 1990, 68, 2292-2300.
- 53 Malkin, S., Herbert, S. K., Fork, D. C. Light distribution, transfer and utilization in the marine red alga *Porphyra perforata* from photoacoustic energy-storage measurement, Biochim. Biophys. Acta, 1990, 1016, 177-189.
- 54 Nery, J. W., Pessoa Jr., O., Vargas, H., Reis, F. de A. M., Gabrielli, A. C., Miranda, L. C. M., Vinha, C. A. Photoacoustic spectroscopy

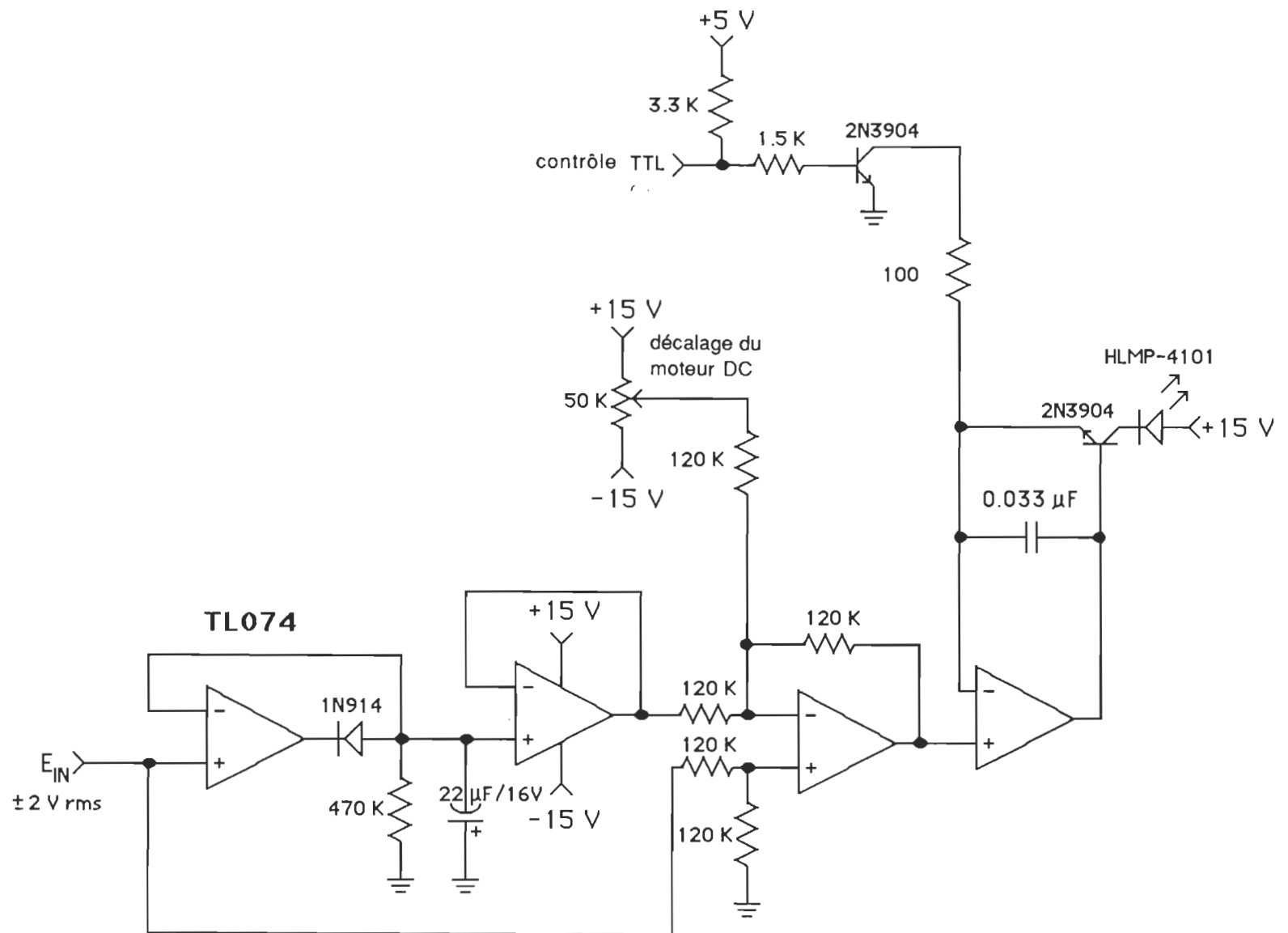
for depth-profile analysis and herbicide monitoring in leaves, Analyst, 1987, 112, 1487-1490.

- 55 Canaani, O., Malkin, S., Mauzerall, D. Pulsed photoacoustic detection of flash-induced oxygen evolution from intact leaves and its oscillations, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1988, 85, 4725-4729.
- 56 Jabben, M., Schaffner, K. Pulsed-laser induced optoacoustic spectroscopy of intact leaves, Biochim. Biophys. Acta, 1985, 809, 445-451.
- 57 Lichtenthaler, H. K., Hak, R., Rinderle, U. The chlorophyll fluorescence ratio F690/F730 in leaves of different chlorophyll content, Photosynthesis Res., 1990, 25, 295-298.
- 58 Hieftje, G. M. Signal-to-noise enhancement through instrumental techniques. Part I. Signals, noise, and S/N enhancement in the frequency domain, Anal. Chem., 1972, 44, 81A-88A.
- 59 Herbert, S. K., Fork, D. C., Malkin, S. Photoacoustic measurements in Vivo of energy storage by cyclic electron flow in algae and higher plants, Plant Physiol., 1990, 94, 926-934.
- 60 Chow, W. S., Melis, A., Anderson, J. M. Adjustments of photosystem stoichiometry in chloroplasts improve the quantum

efficiency of photosynthesis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 7502-7506.

ANNEXE I

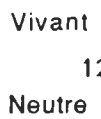
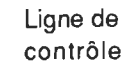
Modulateur de la D.E.L.



MODULATEUR DE D.E.L.

ANNEXE II

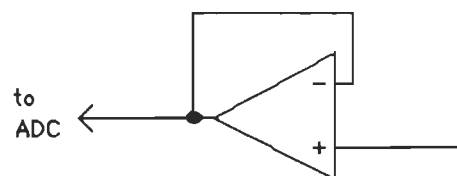
Contrôleur d'obturateur électronique



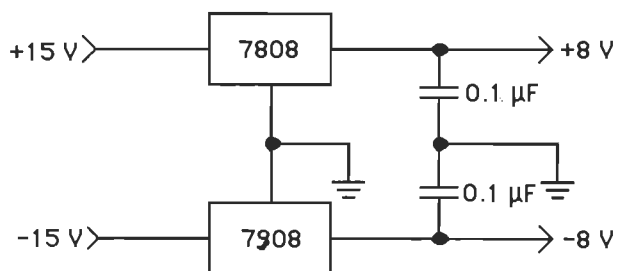
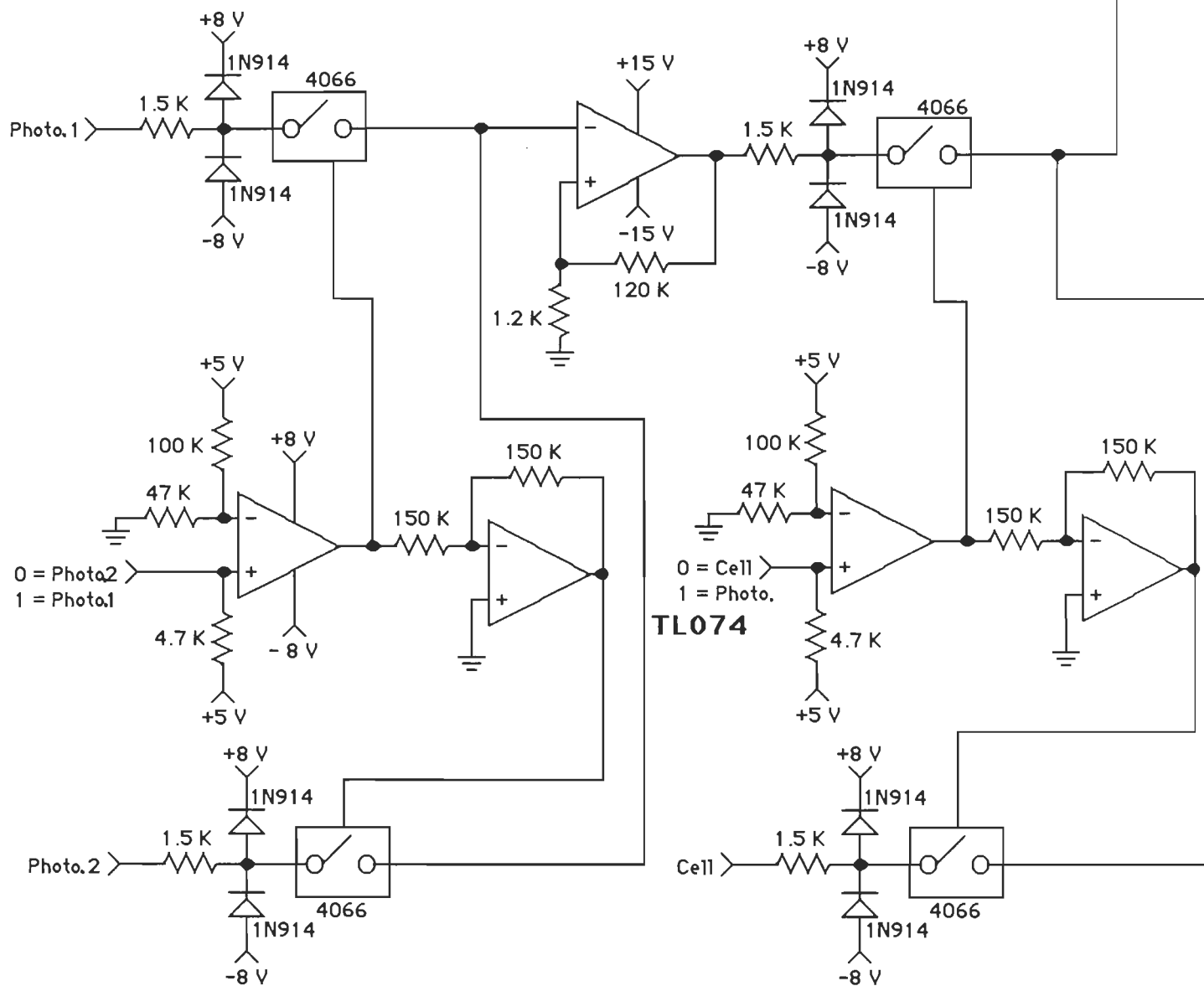
CONTRÔLEUR D'OBTURATEUR ÉLECTRONIQUE

ANNEXE III

Multiplexeur analogique des signaux



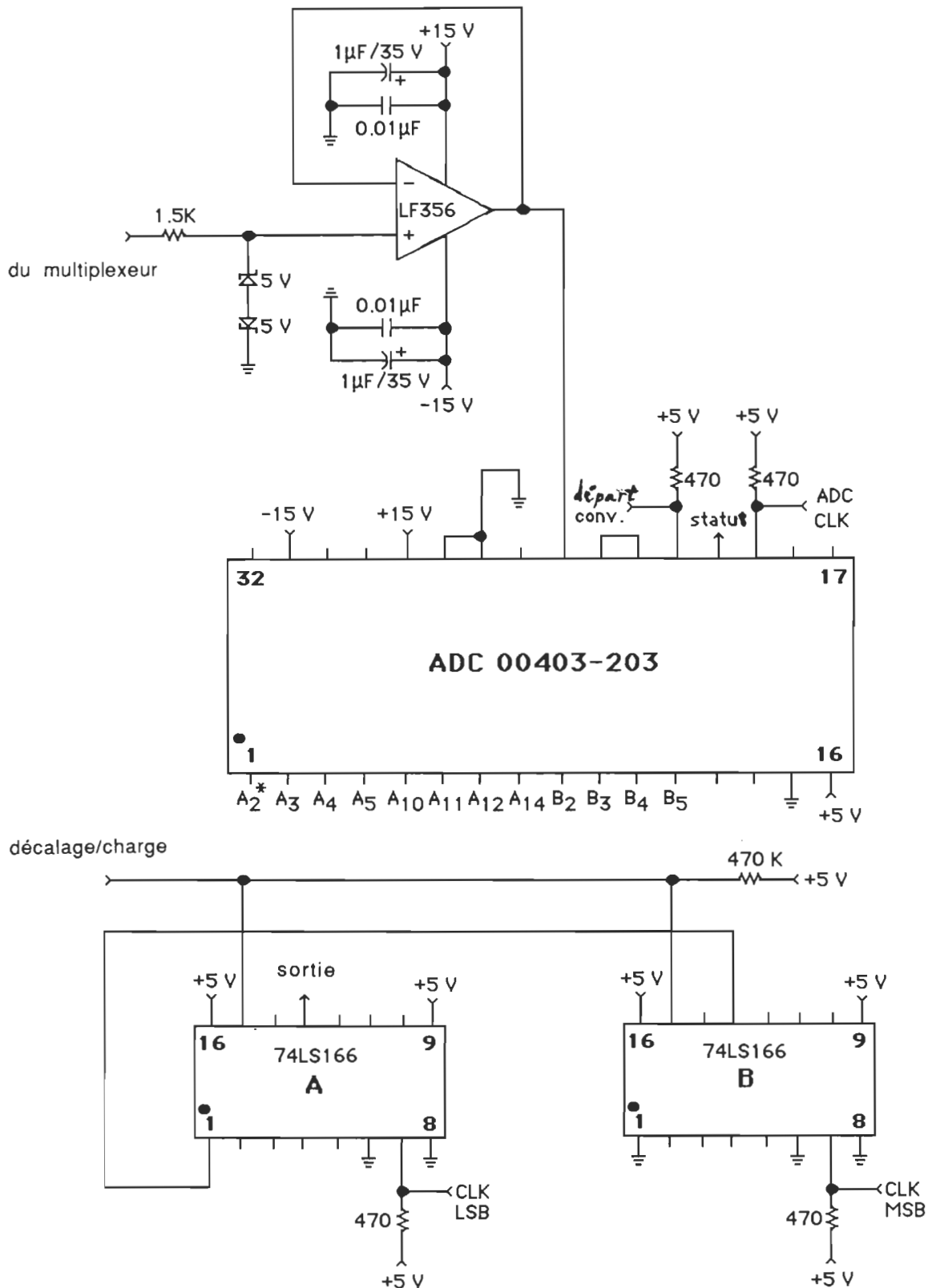
TL072



**MULTIPLEXEUR
ANALOGIQUE
DES SIGNAUX**

ANNEXE IV

Module du CAD

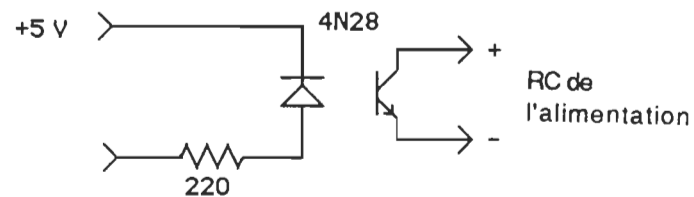
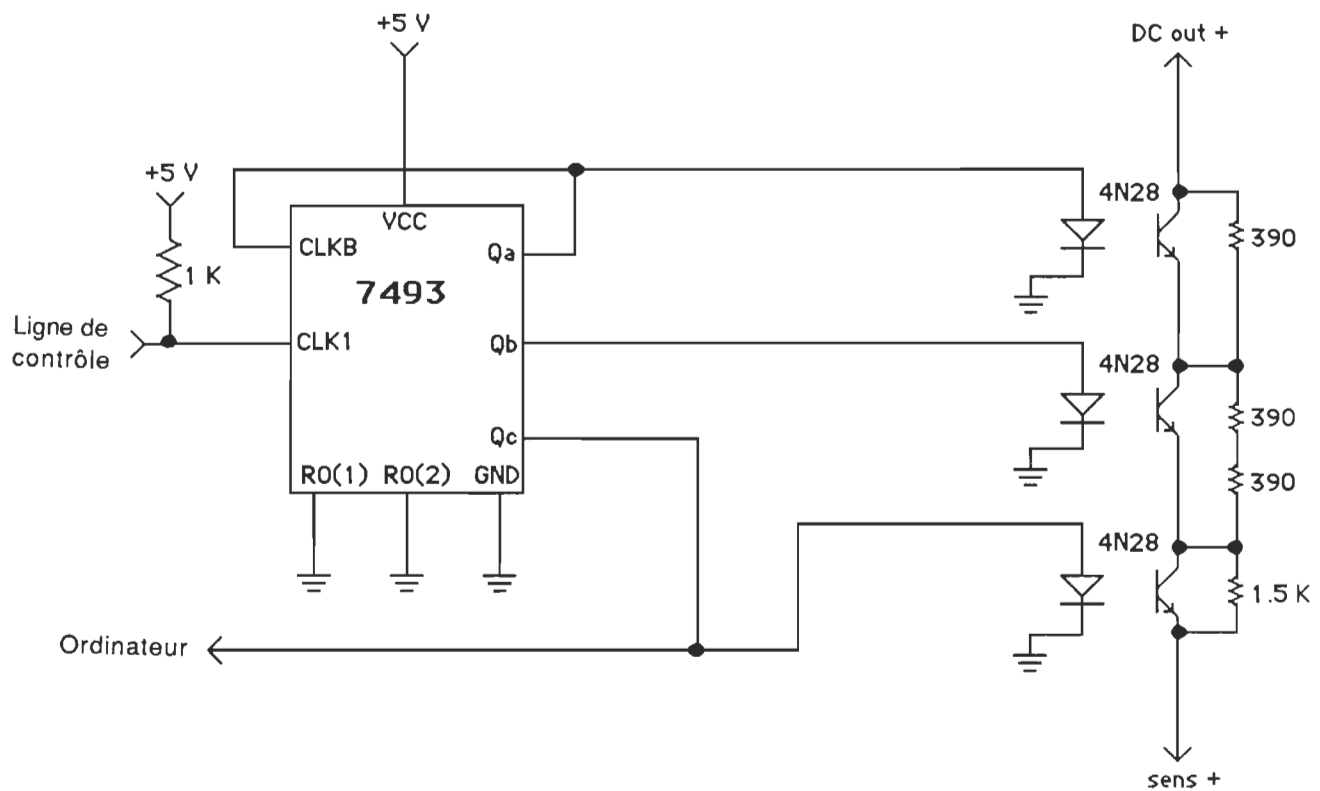


* connection du ADC 00403-203 au 74LS166

MODULE DU CAD

ANNEXE V

Contrôleur d'intensité du faisceau actinique



INTERRUPTEUR DU
FAISCEAU ACTINIQUE

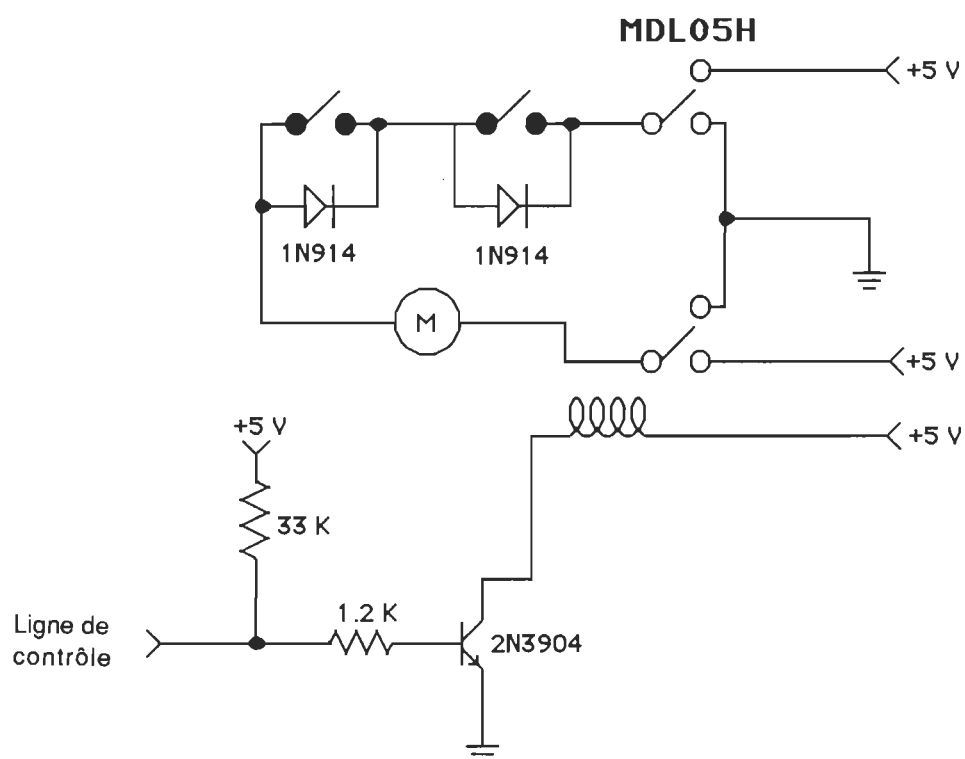
MODIFICATION DE L'ALIMENTATION RAX 12-24

V. ADJ à minimum
1k // avec R62
Déconnecter sens+ / DC out

**CONTRÔLEUR D'INTENSITÉ
DU FAISCEAU ACTINIQUE**

ANNEXE VI

Contrôleur du moteur 5 volts utilisé pour
le déplacement du filtre dichroïque



**CONTRÔLEUR DU MOTEUR 5 VOLTS
UTILISÉ POUR LE DÉPLACEMENT
DU FILTRE DICHROÏQUE**